

Université de Montréal

Fonctionnalisation de substrats pour l'étude des phénotypes de migration cellulaire

par Joannie Roy

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en génie biomédical
3-535-1-0

Décembre 2017

© Joannie Roy, décembre 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :
Fonctionnalisation de substrats pour l'étude des phénotypes de migration
cellulaire

présenté par Joannie Roy

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gregory De Crescenzo, président-rapporteur
Santiago Costantino, directeur de recherche
Jean-Pierre Lavoie, membre du jury
Carole Parent, examinatrice externe
Heather Melichar, représentante du doyen de la FES

Résumé

Parmi les principaux modèles de la migration cellulaire associée à l'inflammation, notons : 1. la migration des neutrophiles en réponse à des signaux de danger et 2. la migration de cellules cancéreuses d'une tumeur primaire vers un site métastatique. Dans les deux cas, la façon par laquelle les cellules traitent l'information des signaux de l'environnement est un facteur clé à la régulation des processus inflammatoires. Ce travail repose sur l'hypothèse selon laquelle la biophotonique, tels la fonctionnalisation de substrat et le traitement d'image, contribue à la compréhension de la migration cellulaire, particulièrement la plasticité des phénotypes migratoires chez les neutrophiles et les cellules cancéreuses. L'objectif du projet était donc d'étudier la migration cellulaire en appliquant les méthodes innovantes de fonctionnalisation de substrat par laser et des algorithmes de suivi des trajectoires.

Dans un premier temps, le but était de déterminer la réponse des neutrophiles aux gradients de molécules chimiotactiques fonctionnalisées sur un substrat de culture. La micro-ingénierie laser de gradients moléculaires sur substrat permet de fabriquer différentes géométries et donc d'étudier *in vitro* la migration par haptotaxie, reproduisant les signaux perçus *in vivo*. J'ai développé un essai d'haptotaxie novateur en modifiant un essai classique de chambre de migration sous agarose ainsi qu'en filmant les neutrophiles à un débit permettant une analyse subtile et automatisée des mouvements des cellules.

Dans un deuxième temps, j'ai appliqué les algorithmes automatisés d'analyse de trajectoires à la caractérisation de phénotypes de neutrophiles associés aux tumeurs. Cette analyse a permis d'identifier des signaux protumoraux sécrétés par l'environnement métastatique propre à un phénotype particulier de neutrophile.

Dans un troisième temps, j'ai adapté la méthode de fonctionnalisation de substrats par laser, cette fois en modifiant directement la surface des cellules migrantes. Pour cette application, le marquage des membranes cellulaires permet d'identifier visuellement et fonctionnellement des cellules ayant un profil migratoire particulier.

Cette thèse met en évidence l'apport des technologies émergentes, telles que la fonctionnalisation de substrats et l'analyse d'images par des algorithmes automatisés, à la compréhension des mécanismes de migration cellulaire. À travers même le contexte de

l'inflammation, j'ai démontré la plasticité des phénotypes dans la réponse cellulaire aux différents signaux de l'environnement. Finalement, j'ai aussi démontré des applications potentielles de la fonctionnalisation membranaire de cellules migrantes à l'étude de différents phénotypes migratoires.

Mots-clés : migration cellulaire, chimiotaxie, haptotaxie, neutrophile, cancer, microenvironnement tumoral, essai de migration, fonctionnalisation de substrat, trajectoire cellulaire, traitement d'image.

Abstract

Amongst the major models of cell migration in the context of inflammation, two are of interest in this thesis: 1. Neutrophil migration in response to danger signals and 2. Migration of cancer cells from a tumour site to a metastatic niche. In both cases, information processing of environmental signals is key to inflammation regulation. The hypothesis supporting this work is that biophotonics, such as substrate functionalization and image processing, contributes to the understanding of cell migration, especially plasticity in migratory phenotypes in neutrophils and cancer cells. Following this, the object of this thesis was to study cell migration applying new methods of substrate functionalization by laser and cell tracking algorithms.

The first objective is to determine the neutrophils response to substrate-bound chemotactic gradients. Laser microengineering of cell culture surfaces with chemotactic cues leads to fabrication of varying gradient shapes and thus, studying *in vitro* haptotaxie processes, closely mimicking *in vivo* signals. I developed a novel migration assay by modifying the classic under-agarose assay and acquiring time-lapse imaging data set to perform subtle automated cell tracking algorithms.

In the second part of this thesis, I apply an automated cell tracking algorithm to the characterization of neutrophil phenotypes associated with cancer. This analysis revealed new cues secreted by the metastatic niche to which only a subtype of neutrophil responds to.

In the last part of the thesis, I adapted the substrate functionalization by laser to directly modify the surface of migrating cells. For this application, functionalizing cell membranes allows to visually and functionally mark cells with outstanding migratory profiles.

This thesis shows the impact of emerging technologies such as substrate functionalization and image processing on the field on cell migration. In the context of inflammation processes, I showed the extent of cell plasticity in response to chemotactic cues. Finally, I also demonstrated potential applications of cell functionalization in studying specific migratory phenotypes.

Keywords : cell migration, chemotaxis, haptotaxie, neutrophil, cancer, tumor microenvironment, migration assay, surface functionalization, cell tracking, image processing.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	3
Avant-propos.....	3
Migration cellulaire.....	4
Un processus universel.....	4
La migration des neutrophiles.....	5
La migration et le cancer.....	8
Justificatif.....	16
Essai de migration.....	17
La diffusion des innovations.....	17
Une perspective historique de l'étude de la chimiotaxie des neutrophiles.....	17
Une perspective historique de l'étude de la migration des cellules cancéreuses.....	22
Justificatif.....	23
Fonctionnalisation de substrat.....	24
L'impression par microcontact.....	24
Fonctionnalisation assistée par laser.....	25
Fonctionnalisation et isolation de cellules.....	27
Traitement et analyse d'image.....	29
Survol des méthodes.....	29
Détection et segmentation.....	29
Suivi des trajectoires.....	34

Problématique et hypothèses.....	35
Problématiques.....	35
Hypothèse centrale.....	35
Objectifs spécifiques testant l'hypothèse.....	35
Objectif spécifique 1	35
Objectif spécifique 2	35
Objectifs spécifique 3	36
Description détaillées des objectifs spécifiques.....	36
Section 1. Conception d'un essai d'haptotaxie	39
Avant-propos.....	39
Méthodologie	39
Isolation et coloration des neutrophiles	39
Fonctionnalisation de substrats de culture (LAPAP).....	40
Fonctionnalisation de CXCL8	41
Préparation des pétris d'agarose	41
Acquisition d'images	42
Détection et suivi des trajectoires	42
Détermination de la sensibilité de la détection	43
Analyse du tenseur de giration.....	43
Indices de chimiotaxie	46
Paramètre de pénétration.....	48
Quantification du LAPAP.....	48
Analyses statistiques	49
Résultats	49
Approche de contenu massif.....	49
Fonctionnalisation de surface	50
Détection et suivi des trajectoires	55
Indices de chimiotaxie	56
Dynamique de la vitesse et de l'orientation	61
Paramètre de pénétration.....	68
Fonctionnalisation de CXCL8	69

Discussion	71
Légendes des films.....	75
Section 2. Chimiotaxie des neutrophiles en contexte tumoral	76
Avant-propos.....	76
Méthodologie	77
Isolation et coloration des neutrophiles	77
Milieu tumoral conditionné.....	77
Préparation des pétris d'agarose	78
Acquisition d'images	78
Détection et suivi des trajectoires	78
Calcul des paramètres statiques de la chimiotaxie.....	79
Résultats	79
Les LDNs répondent aux signaux provenant du foie.....	79
Les LDNs migrent en direction du milieu conditionné de foie	85
Analyse comparative de différents indices de migration	87
Les HDNs migrent plus rapidement que les LDNs	91
L'implication de C3a et de son récepteur dans la réponse chimiotactique.....	92
Discussion	96
Légende du film	98
Section 3. Détection de phénotypes migratoires de cellules cancéreuses.....	99
Avant-propos.....	99
Hypothèse de travail	99
Facteurs limitants considérés	100
Méthodologie	101
Culture des cellules cancéreuses	101
Acquisition d'images	102
Détection et suivi des trajectoires	102
Fonctionnalisation de membranes cellulaires (CLaP)	103
Tri des cellules par dissociation.....	103
Tri magnétique de cellules	104
Statistiques	105

Résultats	107
Hétérogénéité des phénotypes migratoires	107
Les phénotypes migratoires sont conservés dans le temps	110
Enrichissement des phénotypes.	112
Tri par dissociation	113
Tri magnétique	115
Discussion	117
Discussion générale	119
Conclusion	123
Bibliographie.....	i
Annexe 1 : Article de revue sur le guidage axonal, « Lab-On-Chip ».....	i
Avant-propos.....	i
Abstract	iii
Introduction.....	iii
Axon pathfinding and guidance cues	v
Brief historical perspective	vii
Stripe assay	xi
Microcontact printing.....	xiii
Microfluidics.....	xiv
Laser-assisted patterning.....	xvii
Patterning 3D hydrogels	xix
Conclusions.....	xx
Acknowledgments.....	xxii
Annexe 2 : Algorithme de suivi des trajectoires, « Bioinformatics »	xxiii
Avant-propos.....	xxiii
Abstract	xxiv
1. Introduction.....	xxiv
2. Methods.....	xxvi
2.1 Tracking algorithm and mD	xxvi
2.2 Locally adaptive SPT	xxix
2.3 Performance assessment of tracking	xxxi

3. Results and Discussion	xxxiii
3.1 Tracking performance is determined by mD	xxxiii
3.2 Tracking performance is low for inhomogeneous distributions of particles	xxxv
3.3 Adaptive algorithm improves tracking performance	xxxvi
3.4 Adaptive algorithm improves biophysical measurements	xxxviii
3.5 Adaptive algorithm for Neutrophils migration assay.....	xxxix
4. Conclusion	xl
Acknowledgements.....	xli
Supplementary Information	xli
Supplementary Note 1: Results of SPT challenge	xlii
Supplementary Note 2: Detection method for near resolution-limited objects	xliv
Supplementary Note 3: Detection method for neutrophils	xliv
Supplementary Note 4: Optimization of Neighborhood Size Φ	xlvi
Supplementary Note 5: Tracking of particles with unknown dynamics.....	xlvi
Supplementary Note 6: Comparison between the Adaptive method and utrack	lv

Liste des tableaux

Tableau I.	Statistiques des trajectoires de 12 expériences individuelles.....	56
Tableau II.	Front de migration de CXCL8	70
Tableau III.	Ratio de cellules sortant vers l'agoniste ou vers le véhicule	84
Tableau IV.	Décompte absolu de LDNs sortant vers l'agoniste ou vers le véhicule.....	84
Tableau V.	Décompte absolu de HDNs sortant vers l'agnosite ou vers le véhicule	85
Tableau VI.	Valeur de p calculée selon le test U de Mann-Whitney.....	90
Tableau VII.	Comparaison de l'efficacité du CLaP	117
Tableau VIII.	Engineered culture substrate methods to study axon guidance	xxii
Tableau IX.	SPT challenge ranking	xliii
Tableau X.	Parameters and options used for the Adaptive algorithm and U-Track.....	1

Liste des figures

Figure 1.	La chimiotaxie des neutrophiles face à une infection bactérienne	8
Figure 2.	Le microenvironnement tumoral.....	9
Figure 3.	Modèle des sous-populations de neutrophiles	13
Figure 4.	La transition de cellules épithéliales à mésenchymateuses dans le cancer	15
Figure 5.	L'indice de chimiotaxie de McCutcheon.....	18
Figure 6.	Principales approches à l'étude de la migration cellulaire.....	20
Figure 7.	Ramon y Cajal reproduit par fonctionnalisation de substrat.....	26
Figure 8.	Fonctionnalisation assistée par laser – LAPAP	27
Figure 9.	CLaP	28
Figure 10.	Transformations morphologiques de base	33
Figure 11.	Tenseur de giration	45
Figure 12.	Indices de chimiotaxie	47
Figure 13.	Quantification du LAPAP.....	49
Figure 14.	Schéma du LAPAP et des essais de migration sous agarose.....	51
Figure 15.	Caractérisation des gradients de peptides formylés liés au verre	52
Figure 16.	Quantification des molécules liées à la surface	53
Figure 17.	Migration sur un gradient de peptides liés à un substrat.....	54
Figure 18.	Détection des cellules par enrichissement des caractéristiques types.....	55
Figure 19.	Comparaison des types de trajectoires.....	58
Figure 20.	Comportement aléatoire en fin de trajectoire.....	59
Figure 21.	Comparaison des indices de migration	60
Figure 22.	Distribution des vitesses de trajectoires.....	62
Figure 23.	Impact de la concentration sur la vitesse - en fonction de la pente.....	63
Figure 24.	Dynamique de l'orientation des cellules en l'absence de gradient	65
Figure 25.	Dynamique de l'orientation des cellules - peptides formylés solubles.....	66
Figure 26.	Dynamique de l'orientation des cellules - peptides formylés liés au substrat ..	67
Figure 27.	Paramètre de pénétration des neutrophiles	68
Figure 28.	Fonctionnalisation de CXCL8	70
Figure 29.	Chambre de migration sous agarose avec gradient de diffusion.....	81

Figure 30.	Pourcentage de LDNs migrant vers les gradients	82
Figure 31.	Pourcentage des HDNs migrant vers les gradients	83
Figure 32.	Trajectoires des HDNs et des LDNs	86
Figure 33.	Orientation des pas des trajectoires	87
Figure 34.	Indice de migration frontale	88
Figure 35.	Comparaison des indices de chimiotaxie	90
Figure 36.	Vitesse moyenne des trajectoires	92
Figure 37.	Réponse des LDNs au C3a et C5a	93
Figure 38.	Réponse des HDNs au C3a et C5a	94
Figure 39.	Morphologies des LDNs en réponse à différents signaux	95
Figure 40.	Procédure de tri magnétique de cellules	106
Figure 41.	Correspondances phénotypiques	108
Figure 42.	Hétérogénéité des phénotypes morphologiques et migratoires	109
Figure 43.	Conservation des phénotypes dans le temps	111
Figure 44.	Enrichissement de phénotype	113
Figure 45.	Étapes clés du tri par dissociation	115
Figure 46.	Étapes clés du tri magnétique	116
Figure 47.	Page couverture de « Lab on a Chip », volume 13, numéro 4	ii
Figure 48.	Engineered culture substrates	xi
Figure 49.	Nearest-neighbor bond assignment	xxviii
Figure 50.	Particule distribution and sub-network	xxxix
Figure 51.	Performance of nearest-neighbors algorithm	xxxiii
Figure 52.	Tracking performance of spatially inhomogeneous time series.	xxxvi
Figure 53.	Performance of biophysical measures	xxxix
Figure 54.	Adaptive algorithm applied to neutrophils migrating under agarose	xl
Figure 55.	Nearest neighbor distance maps	xlvi
Figure 56.	Typical displacement of a randomly diffusing particle	xlix
Figure 57.	Performance of tracking algorithms for unusually long displacements	li
Figure 58.	Examples of 3 trajectories undergoing unusually long displacements	liii
Figure 59.	Distribution of particle displacement	liv
Figure 60.	Tracking performance of spatially inhomogeneous time series	lvi

Figure 61.	Comparison of methods on the neutrophils assay.....	lix
------------	---	-----

Liste des sigles et des abréviations

ALX :	Récepteur de la lipoxine A ₄
B4F:	Biotine-4-fluorescéine
BSA:	Albumine bovine sérique
C3a:	Composante du complément 3a
C3aR:	Récepteur de la composante du complément 3a
C5a:	Composante du complément 5a
CCD :	Capteur de charge couplé
CCL:	Ligand chimiokine à motif C-C
CD :	Cluster de différenciation
CLaP :	Fonctionnalisation cellulaire par photoblanchiment
CPI :	Indice de précision de chimiotaxie
CXCL8 :	Ligand chimiokine à motif C-X-C 8, interleukine 8
CXCR:	Récepteur à ligand chimiokine à motif C-X-C
Cy5 :	Cyanine 5
DI:	Précision dans la direction
DMEM	Milieu essentiel minimal de Dulbecco.
EBSS :	Saline de Earle
E-Cad :	Cadhérine épithéliale
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA :	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée.
EMT :	Transformation de la forme épithéliale à mésenchymale
FBS:	Sérum bovin foetal
FITC :	Fluorescéine isothiocyanate
FMI :	Indice de migration frontale
fMLF :	Formyle Met-Leu-Phe
fNLFNTK :	Formyle Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys
FPR :	Récepteur des peptides formylés
G-CSF :	Facteur de croissance de la lignée granulocytaire
g-MDSC :	Cellules myéloïdes suppressives de type granulocytaire

HDNs :	Neutrophiles de haute densité
HRP :	Peroxydase de raifort
IL8 :	Interleukine 8
L-15:	Milieu de Leibovitz's
LAPAP :	Fonctionnalisation assistée par laser
LDNs :	Neutrophiles de basse densité
LDS751 :	Quinolinium, 6-(diméthylamino)-2-[4-[4-(diméthylamino)phényl]-1,3-butadiényl]-1-éthyl, perchlorate
LTB4 :	Leukotriène B4
Ly6G+:	Complexe 6 de l'antigène lymphocytaire, locus G
M.C. :	Milieu conditionné
mD :	Déplacement maximum
MET :	Transformation de la forme mésenchymale à épithéliale
N-Cad :	Cadhérine neurale
NEAA	Acides aminés non essentiels
OPD :	o-Phenylenediamine (dihydrochloride)
PDMS :	Polydiméthylsiloxane
PEG :	Polyéthylène glycole
PI(3)Ks :	Phosphoinositide 3-kinases
PTEN :	Phosphatase et homologue de tensine
PDMS:	polydiméthylsiloxane
R _g :	Rayon de giration
RPMI :	Institut Roswell Park Memorial
SD:	Écart-type
SMI:	Indice de migration latérale
Str :	Streptavidine
TANs :	Neutrophiles associés aux tumeurs
TGF-β :	Facteur de croissance transformant bêta
U.A.	Unité arbitraire
WKYMVm :	Trp-Lys-Tyr-Met-Val-L-Met

Dédicace

À Roxane, Alexandre, Marc-André, Lucie et Audrée.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Santiago Costantino pour la confiance qu'il me porte depuis mon arrivée au laboratoire. Grâce à lui, j'ai grandement développé mon autonomie et mes aptitudes à la recherche. Je suis reconnaissante de sa disponibilité, son jugement critique et son amitié.

Merci aux autres membres du laboratoire. Plus particulièrement, merci à Javier Mazzaferri. Je suis reconnaissante de sa disponibilité, son assistance technique et sa rigueur. Je remercie Loïc Binan, pour son écoute, et pour avoir réfléchi régulièrement avec moi sur mes problèmes. Il est aussi à l'origine d'une des technologies, le CLaP, présenté dans cette thèse.

D'autres membres du laboratoire, antérieurs et présents, ont contribué à cette thèse : Jonathan Bélisle, qui a développé le LAPAP et beaucoup des codes originaux dont je me suis inspirée, Isabelle Prévost, stagiaire d'été, avec qui j'ai débuté le projet sur les neutrophiles et aussi Jean-Christophe Pelletier-De-Konnick, stagiaire d'été, qui a réalisé certaines des expériences sur le cancer. Finalement, merci aux autres membres du laboratoire : Kanwarpal Singh, Maxime Gagnon, Maribel Hidalgo, Ali Almasieh, Diane Sayah, Jeff Fenoli, Luke Beaton, Félix Lalonde, Pierre Ghesquiere, Antoine Godin, qui créent tous les jours une superbe ambiance d'équipe.

Je voudrais remercier nos collaborateurs. Dr János G. Filep est un coéquipier clé du projet de développement de l'essai d'haptotaxie. J'estime son expertise et ses conseils. Merci à son équipe d'avoir gracieusement fourni les neutrophiles au cours de toutes ces années.

Dr Peter Siegel et son étudiant au doctorat Brian Hsu ont collaboré étroitement à réaliser le projet sur la plasticité des neutrophiles dans le contexte du cancer. J'adore la fluidité avec laquelle nous arrivons à travailler ensemble.

Le projet étudiant la migration de cellules cancéreuses dans le contexte de la formation de métastases provient initialement d'une idée novatrice développée par Santiago, Dre Claudia Kleinman, Dr Peter Siegel, Dre Josie Ursini-Siegel et Dr Jiannis Ragoussis. Un merci particulier à Claudia qui, en plus d'être un mentor, est une amie précieuse.

J'ai été heureuse de travailler avec Dr Tim Kennedy sur la revue de littérature portant sur la fonctionnalisation de surface appliquée à l'étude du guidage axonal. Bravo pour son

enthousiasme. Dr Kennedy est aussi à l'origine du groupe de réseautage du CRSNG CREATE pour la neuro-ingénierie. J'en profite pour vanter les mérites d'un tel groupe, favorisant tant la collaboration entre laboratoires que la formation scientifique des étudiants.

Merci à d'autres collègues du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont que j'ai côtoyés durant les dernières années : les gens du groupe de Dr Stéphane Lefrançois, les membres du laboratoire de Christos Boutopoulos, la gang de l'aile bleu du CSA, Mikhail Sergeev de la plateforme de microscopie et Mira Jabbour, mon acolyte de bureau.

Finalement, un merci spécial à ma famille. Alex m'a soutenue tous les jours dans l'aventure du doctorat. Il a partagé des doutes, mes frustrations et mes joies. Merci pour sa patience et les sacrifices personnels qu'il a dû faire pendant ces années. Roxane a vu le jour pendant mon doctorat. Elle n'en a pas eu conscience, mais je la remercie pour tous les soirs, les nuits, où je pensais à mes neutrophiles en la berçant. Finalement, merci à ma mère, mon père et ma sœur qui ont toujours cru en moi.

Introduction

La chimiotaxie est un phénomène par lequel les cellules migrent de façon dirigée en réponse à un stimulus dans l'environnement. La chimiotaxie, conservée dans l'évolution, participe à un grand nombre de processus clés en biologie. Notons, entre autres chez l'homme et la souris, la guidance axonale, au cours du développement neuronal, la migration des cellules cancéreuses, lors de la formation de métastases et finalement, la chimiotaxie des leucocytes, impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation. En raison de l'universalité du phénomène et de son rôle dans diverses conditions médicales, il est primordial de bien saisir les enjeux gouvernant la chimiotaxie.

Dans le cadre de cette thèse, trois problématiques d'actualité reliées à la plasticité dans la migration cellulaire nous intéressent. Premièrement, nous nous penchons sur les différences dans les types de signaux perçus par la cellule, soit les molécules solubles chimiotactiques et celles liées aux substrats, responsables de l'haptotaxie. Ensuite, nous considérons deux phénotypes de neutrophiles et établissons en quoi ces phénotypes influencent la réponse aux signaux tumoraux. Finalement, nous explorons la variabilité de potentiels migratoires de cellules cancéreuses ainsi que l'impact de la fonctionnalisation de substrats sur l'étude de cette plasticité.

Les biologistes et cliniciens étudient et mesurent la chimiotaxie à l'aide de différents essais de migration depuis déjà des décennies. Parallèlement, les biophysiciens développent de nouveaux outils et améliorent les algorithmes d'analyse de données. Cependant, les biologistes et les cliniciens n'utilisent pas toutes ces innovations à grande échelle. L'objectif de cette thèse consiste à développer des approches novatrices en biophotonique appliquées à l'étude de la migration cellulaire. Dans le but de faciliter l'implantation de celles-ci dans la communauté, nous nous basons sur des essais actuels en y intégrant principalement deux améliorations : 1. la fonctionnalisation de substrats par photoblanchiment induit par laser et 2. l'analyse de données abondantes.

La thèse est organisée comme suit. La première section est un état des connaissances sur la migration cellulaire, les différents essais de migration existants, les technologies de fonctionnalisation de substrat et finalement sur l'analyse d'image. Mes hypothèses de travail suivent la revue de la littérature. Ensuite, je présente une transcription d'un article publié en

2017 sur la mise au point d'un essai d'haptotaxie. Cette section représente le cœur de ma thèse. J'y ai aussi intégré certaines données non publiées, mais d'intérêt pour cette thèse. La section suivante étale les résultats d'une collaboration avec Dr Siegel et son étudiant au doctorat, Brian Hsu. Nous rédigeons actuellement un article dont Brian Hsu et moi-même sommes tous deux les co-premiers auteurs. S'en suivent les résultats d'un dernier projet qui se poursuit toujours. Ces données présentent le potentiel de la fonctionnalisation des membranes cellulaires afin d'en étudier le phénotype migratoire. Ensuite, une discussion générale et une conclusion résumant les résultats, les retombées, les limitations et des perspectives d'avenir suivent. Deux articles publiés également pendant ma thèse se trouvent en annexe ; soit un article de revue sur les technologies émergentes dans l'étude du guidage axonal et un article sur un algorithme de suivi des trajectoires dont je suis le second auteur. Ces articles, étant rédigés à l'origine en anglais, ont été insérés tels quels, puisqu'ils ne constituent pas le corps de ma thèse. Afin de ne pas alourdir la thèse, et comme sa traduction figure dans la section 1, l'article original anglais de Scientific Reports n'a pas été inclus dans les annexes.

Revue de littérature

Avant-propos

Alors qu'une partie du texte de la section « Revue de littérature » est originale, certaines sous-sections et figures sont inspirées d'articles que j'ai publiés. Premièrement, la section sur la migration des neutrophiles provient partiellement de l'introduction de l'article suivant :

**« A Haptotaxie Assay for Neutrophils using Optical Patterning and a High-content Approach » Joannie Roy, Javier Mazzaferri, János G. Filep, et Santiago Costantino
Scientific Reports 2016, 7 : 2869**

J'ai contribué de façon majeure à toutes les étapes de la réalisation de cet article. Soit, la conception du projet (conjointement avec tous les autres auteurs de l'article), la réalisation de toutes les expériences, l'écriture de l'algorithme d'analyse d'image (conjointement avec SC et JM), les analyses (conjointement avec SC et JM) et la rédaction du manuscrit (conjointement avec tous les auteurs. Cet article est le cœur de ma thèse.

Les sections sur les chambres microfluidiques, l'impression par microcontact et la fonctionnalisation assistée par laser sont inspirées de la revue de littérature suivante :

« Engineered cell culture substrates for axon guidance studies: moving beyond proof of concept » Joannie Roy, Timothy E. Kennedy et Santiago Costantino. Lab on a Chip, 2013, 13, 498

Ces trois méthodologies s'appliquent tant à l'étude du guidage axonal, sujet principal de l'article, qu'à l'objet de cette thèse : la migration cellulaire dans le contexte de l'inflammation et du cancer. En tant que première auteure de cet article de revue, j'ai écrit le premier jet de l'article et j'ai participé activement à la réécriture de versions subséquentes de l'article. J'ai aussi réalisé les figures, dont la page couverture de ce numéro (Figure 7 de cette thèse).

Finalement, une partie de la section « Traitement et analyse d'image » est inspirée de l'article que j'ai publié en 2015 :

« Adaptive settings for the nearest-neighbor particle tracking algorithm » Javier Mazzaferri, Joannie Roy, Stéphane Lefrançois et Santiago Costantino. Bioinformatics, 2015, 31 (8), 1279

J'ai contribué à cet article par des sessions de brainstorming avec Javier Mazzaferri et Santiago Costantino. J'ai aussi généré les données biologiques nécessaires pour les tests de performance et rédigé la section portant sur cette méthode. J'ai aussi participé à la relecture du manuscrit.

Migration cellulaire

Un processus universel

À première vue, le corps humain nous semble assez rigide et nous le considérons rarement comme un lieu de mouvance et de fluidité. Pourtant, une grande proportion de nos cellules se déplacent constamment dans nos tissus en réponse à différents signaux. Les cellules commencent d'ailleurs à migrer dès l'embryogenèse (Tessier-Lavigne and Goodman 1996). En effet, en réponse aux signaux présents dans l'embryon, les cellules se différencient, se spécialisent et se placent dans l'espace. Particulièrement, les axones croissent en longueur des dizaines de fois le diamètre du corps cellulaire et suivent un schéma directionnel bien précis. Le guidage axonal s'opère lorsque les neurones perçoivent une gradation dans la force d'un signal en fonction de la distance de ce signal. En annexe à cette thèse, un article de revue présente la contribution de l'ingénierie biomédicale à l'étude du guidage axonal (Roy, Kennedy et al. 2013). Similairement aux neurones, en raison de leur importance biologique et leur spécialisation à migrer, d'autres types cellulaires sont devenus des modèles pour l'étude de la migration cellulaire. Notons deux types cellulaires qui font l'objet de cette thèse, soit les neutrophiles et les cellules cancéreuses. Les neutrophiles, globules blancs gardiens de l'immunité, se déplacent à la recherche de sites d'infection ou d'inflammation en réponse à la détection de signaux de danger (Beutler and Williams 2001; Nathan 2006). Pour leur part, les cellules cancéreuses sont bien connues pour leur plasticité et leur capacité à quitter une tumeur primaire pour coloniser d'autres organes (Clark and Vignjevic 2015; Roussos, et al. 2011). En fait, plusieurs mécanismes propres à la migration sont conservés d'une espèce ou d'un type cellulaire à l'autre (Tang, et al. 2014). Trois processus apparus tôt dans l'évolution des eucaryotes gouvernent la

migration, soit : la reconnaissance d'un gradient dans la concentration d'un signal, la polarisation cellulaire et la motilité cellulaire (Ananthakrishnan and Ehrlicher 2007; Shi, et al. 2013; Tang, et al. 2014; von Philipsborn and Bastmeyer 2007).

C'est à la fin du 19^e siècle qu'apparut le terme chimiotaxie (Harris 1954), définissant la migration d'une cellule spécifiquement en direction d'un signal, par opposition à une migration aléatoire spatialement. Toutefois, au cours des ans, plusieurs préfixes apparurent au fur et à mesure qu'on saisissait l'ampleur et la diversité des signaux migratoires (Ricoult, et al. 2015; Roca-Cusachs, et al. 2013). D'intérêt pour cette thèse, notons le terme « haptotaxie » apparu en 1965, définissant le processus par lequel la cellule perçoit un signal séquestré sur un substrat (Carter 1965; Carter 1967; Keller, et al. 1979; Ricoult, et al. 2015)

La migration des neutrophiles

Sentinelles de l'immunité

C'est à Paul Ehrlich qu'on doit le terme « neutrophile ». En 1880, on commençait à peine à prendre conscience des processus de maturation et de spécialisation des différents types de globules blancs. Alors, on les caractérisa pour leur incapacité à retenir les colorants acides ou basiques, et pour leur propension à y préférer les neutres (Coffelt, et al. 2016; Kaufmann 2008). Depuis, nos connaissances des neutrophiles ne cessent de croître. Le neutrophile constitue le type de globules blancs le plus abondant dans le corps humain, correspondant à 50-70 % de tous les leucocytes (Summers, et al. 2010). 10^{11} neutrophiles sont produits chaque jour dans la moelle osseuse et dans la rate, et de ce nombre, 1-2 % circulent dans le sang. Les neutrophiles mûrissent séquentiellement de myéloblastes en promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes. Une fois sortis de la moelle osseuse, ces cellules ne se divisent plus et leur noyau se segmente. Les neutrophiles sont amiboïdes, d'environ 10 μm de diamètre et très mobiles (Beutler and Williams 2001).

Même si leurs rôles ne s'y limitent pas, les neutrophiles sont particulièrement connus pour leur habileté à combattre les infections bactériennes (Nathan 2006). Élie Metschnikoff, vers la fin des années 1880, observe que certains leucocytes migrent vers des bactéries dans différents tissus animaux, ceux-ci phagocytant des bactéries et des débris cellulaires (Cavaillon 2011).

Metschnikoff définit ces cellules comme des phagocytes, incluant dans ce groupe les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (Metschnikoff 1887; Metschnikoff 1891). Lors des infections bactériennes, les neutrophiles sont les premiers répondants. Ils circulent dans le sang et sont mobilisés au site d'infection par les déchets métaboliques sécrétés par les bactéries (Schiffmann, et al. 1975a) et les signaux envoyés par les cellules sentinelles présentes dans les tissus (Phillipson and Kubes 2011). Au site d'infection, les neutrophiles attaquent les bactéries par phagocytose, par dégranulation d'enzymes protéolytiques et la relâche de trappes extracellulaires de protéines et d'ADN. Lorsque les neutrophiles pionniers atteignent la cible, ils amplifient les signaux de dommage au tissu en sécrétant des molécules endocrines tel le lipide leucotriène B4 (Lammermann, et al. 2013). De ces processus, s'en suit le recrutement d'autres neutrophiles. Cet influx de neutrophiles cesse avec le recrutement tardif de monocytes et de macrophages. L'avènement de ces acteurs contribue aussi au remodelage tissulaire, isolant la plaie des tissus sains environnants (Lammermann, et al. 2013). L'inflammation est résolue lorsque les neutrophiles eux-mêmes meurent par apoptose et par phagocytose (Serhan, et al. 2008; Soehnlein and Lindbom 2010).

Cellules chimiotactiques

La motilité des neutrophiles circulant dans le sang est régulée par les molécules chimiotactiques présentes et par l'expression coordonnée de molécules d'adhésion sur les neutrophiles et sur les cellules endothéliales (Figure 1) (Billadeau 2008; McDonald, et al. 2010). Comme les neutrophiles rencontrent plusieurs molécules chimiotactiques, ils priorisent et intègrent les signaux assurant une migration préférentielle vers le site d'inflammation (Heit, et al. 2008; Majumdar, et al. 2014). Les neutrophiles reconnaissent des chimiokines comme le CXCL8, que l'on croit lié à la surface des cellules endothéliales. Ce dernier forme un gradient stable guidant les neutrophiles vers leur cible (Massena, et al. 2010; Rot 1992; Rot 1993; Sarris, et al. 2012). Le CXCL8 se lie avec une grande affinité aux récepteurs CXCR1 et CXCR2 et déclenche la chimiotaxie des neutrophiles par l'activation des phosphoinositide 3-kinases (PI(3)Ks) et de la voie de signalisation de la phosphatase et homologue de tensine (PTEN) (Foxman, et al. 1997; Foxman, et al. 1999; Heit, et al. 2008). Les neutrophiles changent alors de forme, se polarisent, rampent le long du gradient de concentration et migrent à travers l'endothélium vers les tissus (Ley, et al. 2007). Pour leur part, les peptides formylés d'origine

bactérienne ou mitochondriale (Zhang, et al. 2010) activent la voie de signalisation de la kinase activée par le mitogène p38 à travers le récepteur formyle peptide (FPR1) et le récepteur FPR2/lipoxin A4. En cas de présence de multiples signaux, cette voie est priorisée par rapport à la voie des PI(3)Ks (Foxman, et al. 1997; Heit, et al. 2008), permettant ainsi aux neutrophiles d'atteindre le foyer de l'inflammation (McDonald, et al. 2010). Due aux caractéristiques ci-mentionnées, les peptides naturellement ou synthétiquement formylés, tels le N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) et le formyl-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (fNLFNTK) sont des signaux dits cibles (« End-Target Signal »), alors que le CXCL8 est considéré comme un signal chimiotactique intermédiaire (Heit, et al. 2008; Niedel, et al. 1979; Rot, et al. 1987).

En plus du CXCL8 et des peptides formylés, un large éventail de molécules chimiotactiques régulent finement la migration des neutrophiles dans le temps et dans l'espace. Notons, par exemple, qu'en plus des peptides formylés, le récepteur FPR2/ALX lie aussi un nombre de protéines et de ligands lipidiques impliqués dans des réponses immunitaires opposées à celle des peptides formylés (Cooray, et al. 2013). Ces ligands régulent ainsi l'effet des peptides formylés et participent donc à la résolution de l'inflammation. Notons aussi parmi les signaux cibles, les molécules du système complémentaire. Les molécules anaphylactiques comme le C5a, molécule proinflammatoire, et le C3a, au rôle immunorégulateur, sont toutes deux connues comme étant chimiotactiques (Coulthard and Woodruff 2015; Wu, et al. 2013). Parmi les signaux intermédiaires, en plus du CXCL8, plusieurs chimiokines, elles aussi associées à l'haptotaxie, en raison de leur motif de liaison au protéoglycane, sont considérées comme chimiotactiques ou du moins participent à guider les cellules lors de la migration (Monneau, et al. 2015). Finalement, comme mentionné précédemment, on considère le leucotriène B4 (Artemenko, et al. 2014) comme une molécule de relai, amplifiant les signaux initiaux.

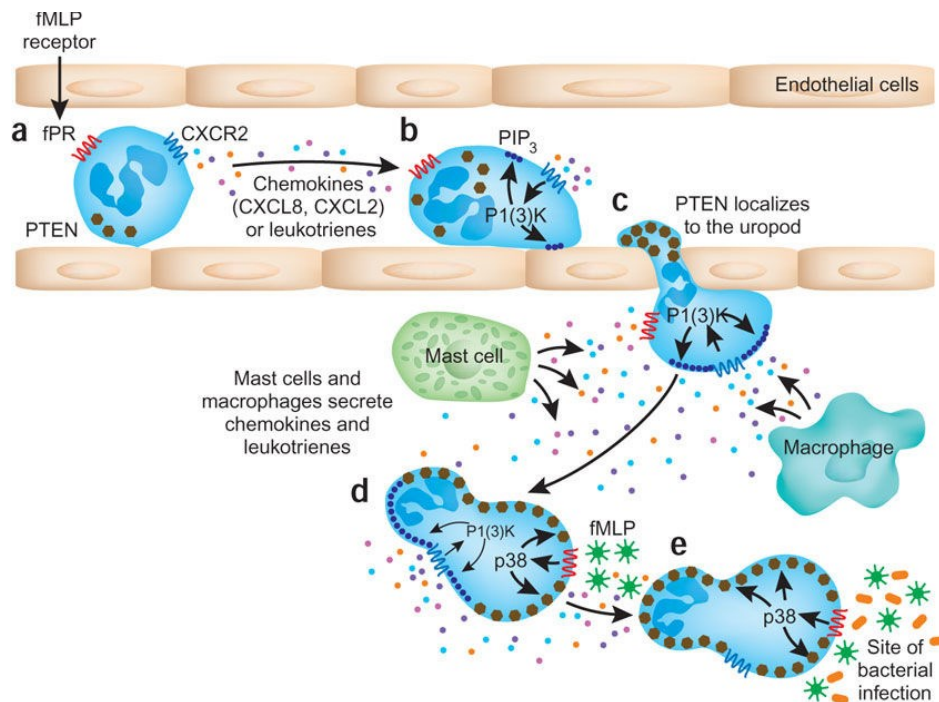


Figure 1. **La chimiotaxie des neutrophiles face à une infection bactérienne**

Les neutrophiles activés circulant dans le sang s'attachent aux parois des vaisseaux sanguins et rampent sur ceux-ci en direction des chimiokines présentes avant de transmigration vers les tissus où ils rencontrent des signaux des cellules sentinelles et des bactéries. Les voies du PI(3)K et de p38 régulent cette réponse inflammatoire. Reproduit avec permission. (Billadeau 2008).

La migration et le cancer

Microenvironnement tumoral et inflammation

Dvorak, en 1986, a décrit les tumeurs comme des plaies qui ne guérissent pas (« Tumors : wounds that do not heal »), saisissant dans cette phrase l'essence de l'impact de la dérégulation de l'inflammation dans l'environnement tumoral (Brandau, et al. 2013; Dvorak 1986; Dvorak 2015). Ainsi, alors qu'on pourrait croire que le système immunitaire, par des mécanismes d'immunosurveillance ou par la cytotoxicité dérivée du complément, pourrait détruire les cellules tumorales, la réalité est plus complexe (Markiewski and Lambris 2009). L'inflammation ne participe à l'élimination de cancer que lorsqu'elle est aiguë ou polarisée spécifiquement vers un type de réponse (Breitbach, et al. 2007; Horl, et al. 2013; Meyer, et al. 2014; Swann and Smyth 2007; Wiemann and Starnes 1994). À l'opposé, pour les tumeurs où l'inflammation s'installe de manière chronique, on trouve une corrélation négative entre le

pronostic et la présence de cellules immunitaires (Dumitru, et al. 2013; Shen, et al. 2014). En fait, les tumeurs constituent des microenvironnements complexes composés, en plus des cellules tumorales et du stroma, de cellules immunitaires et de vaisseaux sanguins (Figure 2) (Joyce and Pollard 2009; Mantovani, et al. 2008). Lors de l'implantation de cellules cancéreuses, les composants de l'environnement pré-tumoral ou pré-métastatique sécrètent une multitude de signaux, relayés par le sang et ensuite amplifiés par la venue de nouveaux acteurs du système immunitaire. Ces signaux favorisent le remodelage tissulaire, l'angiogenèse et la prolifération, permettant ainsi l'établissement de la niche tumorale, mais inhibant aussi la résolution de la réponse inflammatoire (Mantovani, et al. 2008; Mantovani, et al. 2011; Shaul and Fridlender 2017). La définition de cancer utilisée dans cette thèse provient de J. Ewing, dictant qu'une tumeur maligne, ou néoplasme, constitue une croissance tissulaire relativement autonome et altérée génétiquement (Ewing 1922; LaFond 2012). Pour alléger le texte, le terme 'maligne' a été omis.

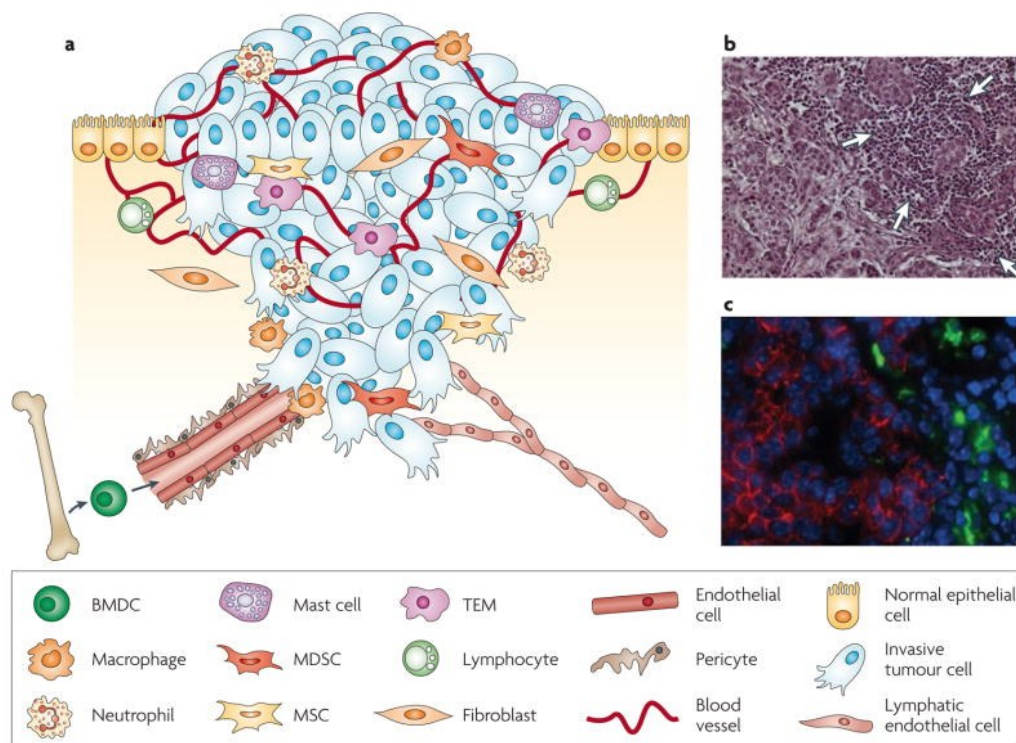


Figure 2. **Le microenvironnement tumoral.**

(a) Le microenvironnement tumoral est composé de cellules cancéreuses, de cellules du stroma, de vaisseaux sanguins, de cellules immunitaires et d'une matrice extracellulaire. (b) Les flèches indiquent l'infiltration leucocytaire à la périphérie d'un cancer du sein. (c) Les macrophages présents dans un cancer du pancréas expriment la cathepsine B (en vert), ce qui est associé avec la perte de l'expression de la e-cadherine des cellules cancéreuses environnantes (en rouge). La dérégulation de e-cadherine est un marqueur de la transition d'une morphologie endothéliale à mésenchymateuse (« MET »), indiquant un phénotype invasif. Reproduit avec permission (Joyce and Pollard 2009).

Des preuves cliniques et des modèles *in vivo* et *in vitro* montrent la complexité des signaux tumoraux et relayés dans le sang. Par exemple, la quantité de certaines cytokines, telles G-CSF, CXCL8, CCL2, CCL4 et CCL5, présentes dans le sérum de patients atteints de cancer est plus élevée que chez les individus sains (Granot, et al. 2011; Trellakis, et al. 2011). Les cytokines et autres facteurs sécrétés dans les tumeurs ou circulant dans le sang peuvent provenir tant des cellules cancéreuses, du stroma, du système du complément, de la coagulation que des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (Galdiero, et al. 2013; Markiewski and Lambris 2009; Stanger and Kahn 2013). De plus, l'environnement physique et chimique promeut aussi l'inflammation et la migration cellulaire par des gradients de pH, d'ions, d'oxygène, d'alignement fibrillaire et de rigidité (Oudin and Weaver 2016). Nous porterons un intérêt particulier sur certains exemples de signaux chimiotactiques pour les neutrophiles.

Ces molécules peuvent être directement impliquées dans la chimiotaxie, tels les gradients de CXCL8 ou de C5a, ou plus indirectement associées à la régulation des leucocytes en général. Par exemple, le sérum de patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou contient une grande quantité de CXCL8, et *in vitro*, il stimule la chimiotaxie des neutrophiles (Trellakis, et al. 2011). Pour leur part, le groupe de Ventura *et al.* a démontré que le surnageant de métastases de mélanome humain était chimiotactique pour les neutrophiles sans identifier la composition exacte du surnageant (Ventura, et al. 1991). Les signaux sécrétés par les tumeurs régulent les cellules immunitaires de manière complexe. L'interleukine-1 prolonge la vie des neutrophiles et les reprogramme (Mantovani 2009). Finalement, la régulation peut même être organe-dépendante. Par exemple, en 2011, Granot *et al.* ont montré le recrutement différentiel de neutrophiles aux métastases du poumon comparé à celles du foie dans un modèle de tumeur primaire du sein (Granot, et al. 2011).

Plasticité chez les neutrophiles

On a longtemps pensé qu'une fois matures, les neutrophiles ayant quitté la moelle osseuse, leur destin était fixé. Toutefois, ce paradigme évolue (Mantovani, et al. 2011). En plus d'être des effecteurs de l'immunité innée, il a été démontré que les neutrophiles sont des régulateurs de l'immunité. Ceci est illustré par l'éventail de cytokines, chimiokines, et autres facteurs qu'ils sécrètent (Tecchio, et al. 2014) et par l'induction de l'expression temporelle de certains gènes (Kotz, et al. 2010; Shaul, et al. 2016). Parmi leurs rôles régulateurs, notons la résolution de l'inflammation, avec l'action concertée des monocytes et des macrophages (Serhan, et al. 2008; Soehnlein and Lindbom 2010). Dans les dernières phases de l'inflammation, la biosynthèse lipidique change et les neutrophiles produisent de la lipoxine A4, des résolvines et des protectines, bloquant ainsi le recrutement de nouveaux neutrophiles, favorisant aussi leur retrait en induisant leur apoptose et leur phagocytose. Cette plasticité dans les phénotypes des neutrophiles s'exprime aussi dans certaines pathologies où les processus inflammatoires sont dérégulés. Particulièrement, notons ainsi le rôle clé des neutrophiles dans la progression de nombreux types de cancers (Kim and Zhang 2016; Mantovani, et al. 2008).

Les phénotypes de neutrophiles dans le cancer

Dans les dernières années, on décrit les différents phénotypes de neutrophiles associés au cancer selon leur localisation, leur morphologie, leur maturité, leurs rôles et leur densité tant dans les tumeurs que dans la circulation (Mishalian, et al. 2017). On trouve, par exemple, des neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) qui sont soit antitumoraux (N1) ou protumoraux (N2) (Fridlender, et al. 2009). Fridlender *et al.*, en 2009, ont démontré que le TGF- β dans les tumeurs change le phénotype des neutrophiles ; la présence de TGF- β est associée à de plus grosses tumeurs contenant des neutrophiles de type N2 alors que le blocage de cette voie diminue la taille des tumeurs et mène à une accumulation de TANs de type N1. Le microenvironnement complexe entourant la tumeur participe à son propre maintien par l'interaction des acteurs présents. Ainsi, le C5a, en plus d'être chimiotactique pour les neutrophiles, augmente la production de TGF- β , favorisant ainsi le phénotype protumoral des neutrophiles (Markiewski, et al. 2008; Markiewski, et al. 2017; Vadrevu, et al. 2014). Ces derniers libèrent alors des

métallopeptidases, remodelant la matrice et donc favorisant la motilité et l'invasion des cellules cancéreuses (Nitta, et al. 2013).

Pour ce qui est des neutrophiles circulant dans le sang et de leur phénotype dans le cancer, Savig *et al.*, en 2015, ont décrit ceux-ci en fonction de leur densité respective dans un gradient de Bøyum (Boyum 1968). En effet, ils ont trouvé deux populations, soit : les neutrophiles de haute densité (HDNs) et ceux de basse densité (LDNs) (Savig, et al. 2015). Les HDNs sont des cellules matures aux propriétés antitumorales (de type N1) alors que les LDNs sont un mélange hétérogène de cellules matures protumorales (de type N2) et de cellules immatures myéloïdes suppressives granulocytaires (g-MDSC) (Figure 3). En 2017, le même groupe propose plutôt de nommer les neutrophiles circulants N1c, N2c et g-MDSC, c'est-à-dire en fonction de leurs propriétés pro ou anti-tumorales, de leur maturité et de leur localisation dans la circulation (« c »). Selon leurs expériences avec des chambres à filtre de Boyden, les LDNs migrent moins que les HDNs en présence de surnageant de lignée murine de carcinome mammaire 4T1. Les LDNs ont aussi des propriétés anti-inflammatoires réduites. Ainsi, le groupe de recherche formule l'hypothèse que les LDNs sont peut-être normalement impliqués dans la résolution de l'inflammation, mais que comme celle-ci n'a pas lieu, les LDNs s'accumulent dans le sang, favorisant la progression de la tumeur (Mishalian, et al. 2017). Dans le même ordre d'idées, le développement de certaines tumeurs est associé avec le nombre de neutrophiles de phénotype protumoral dans le sang, le nombre de neutrophiles infiltrant les tumeurs et une hypercoagulation (Guglietta, et al. 2016; Nabizadeh, et al. 2016). Par le système complémentaire, l'hypercoagulation conduirait à une présence accrue de C3a, affectant la fonction effectrice des LDNs exprimant le C3aR. Ces derniers réduisent alors la production de dérivés réactifs de l'oxygène, favorisant un environnement protumoral (Guglietta, et al. 2016).

On retrouve des neutrophiles de faible densité dans d'autres pathologies inflammatoires comme l'asthme ou le Lupus et aussi en faible quantité chez les individus sains (Denny, et al. 2010; Herteman, et al. 2017). Toutefois, le profil de ces neutrophiles varie légèrement de celui décrit précédemment dans le cancer. Par exemple, Herteman *et al.*, ont observé que les LDNs de chevaux asthmatiques ainsi que ceux d'individus contrôles expriment plus de récepteurs aux peptides formylés (FPR1) que les neutrophiles de densité normale et qu'ils sont proinflammatoires (Herteman, et al. 2017).

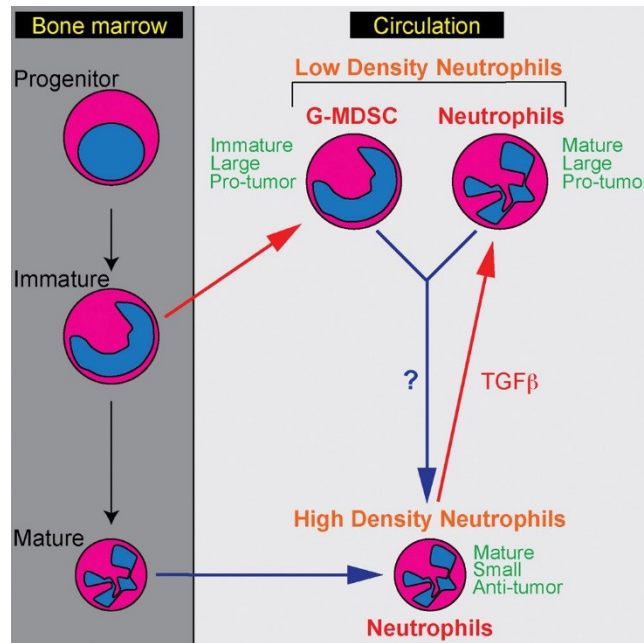


Figure 3. **Modèle des sous-populations de neutrophiles**

Les neutrophiles circulant dans le sang présentent différents profils associés à leur densité, à leur morphologie et à leurs propriétés tumorales. Les neutrophiles de haute densité (HDNs) sont matures et antitumoraux. Les neutrophiles de basse densité (LDNs) représenteraient une population hétérogène composée de neutrophiles matures et de cellules immatures myéloïdes suppressives granulocytaires. Les LDNs seraient protumoraux. Reproduit avec permission (Sagiv, et al. 2015)

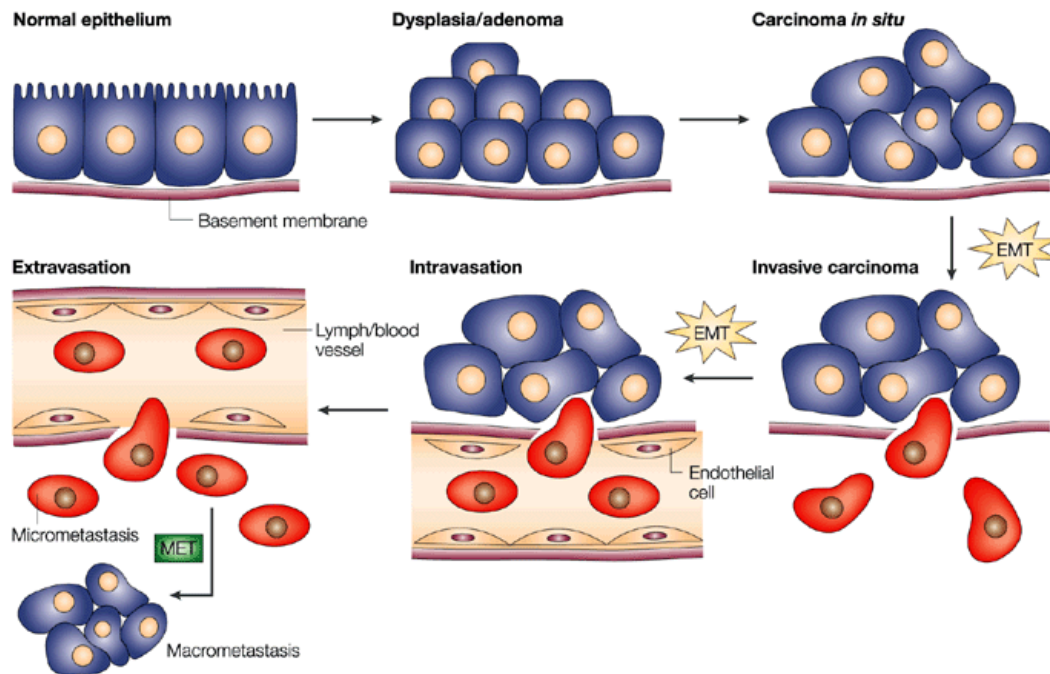
La migration des cellules cancéreuses

Chaque cellule du corps a son identité propre et son rôle à jouer ; le tout étant normalement bien orchestré. Toutefois, une tumeur maligne, un néoplasme, est une masse de cellules ayant échappé à leur destinée par l'accumulation séquentielle de mutations à leur génome (Lyons, et al. 2008). Ces cellules ont acquis des phénotypes prolifératifs, changent de morphologie, esquivent la sénescence et à l'apoptose et sont angiogéniques (Hanahan and Weinberg 2000). Un pourcentage de ces cellules tumorales acquièrent la capacité de se mouvoir et d'envahir les organes distants. Ce sont ces cellules qui causent les métastases, sites de tumeurs secondaires. Les cellules cancéreuses mobiles doivent quitter le stroma pour émigrer vers la circulation et atteindre ainsi d'autres organes (Clark and Vignjevic 2015).

Les cellules cancéreuses migrent soit individuellement soit collectivement, en feuillets de cellules adhérentes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons sur le premier mode de migration, où les cellules ont peu de contacts cellule-cellule, et plus particulièrement sur un

type de cancer du sein, soit la lignée cellulaire MDA-MB-231. Ce sont des changements morphologiques dus à des mutations ou à un microenvironnement tumoral favorable qui permettent à la cellule de migrer (Lyons, et al. 2008). En effet, les cellules cancéreuses mobiles sont de morphologie amiboïde, c'est-à-dire de forme changeant rapidement ou de morphologie mésenchymale, c'est-à-dire en forme de fuseau (« spindle-like ») (Friedl and Wolf 2010; Talkenberger, et al. 2017).

Les cancers du sein sont divisés en sous-types selon la présence de certains marqueurs, dictant eux-mêmes le pronostic du cancer. Certains cancers sont considérablement plus agressifs que d'autres, dont le cancer « claudin-low », défini entre autres par une faible expression des protéines de jonctions cellulaires « claudin » 3, 4 et 7 ainsi que d'autres marqueurs de différenciation luminale (Prat, et al. 2010). La transition stable de cellules épithéliales à mésenchymateuses (« Epithelial Mesenchymal Transition » - EMT) caractérise ce sous-type de cancer (Figure 4). La lignée MDA-MB-231 est un modèle *in vitro* des cancers de type « claudin-low » mettant en évidence les facteurs influençant cette transition vers un phénotype mésenchymateux. Les cellules épithéliales qui se sont transformées en cellules mésenchymateuses perdent l'expression de E-cad aux jonctions cellulaires et gagnent l'expression d'autres marqueurs comme la N-cad ou la vimentine (Bhowmick, et al. 2001; Thiery 2002). Différents signaux, tel le TGF- β , présent dans l'environnement tumoral, régulent ces transitions par des facteurs de transcription comme Snail1/2, Zeb1/2, and Twist1/2 (Berx and Van Roy 2001; Bhowmick, et al. 2001; Drasin, et al. 2011).



Nature Reviews | Cancer

Figure 4. **La transition de cellules épithéliales à mésenchymateuses dans le cancer**

Les cellules deviennent cancéreuses par l'accumulation de mutations génétiques et par la présence de facteurs protumoraux. Les cellules de l'épithélium transitent de la forme épithéliale à mésenchymateuse, favorisant l'invasion des cellules vers les organes distants. Reproduit avec permission. (Thiery 2002).

Il existe, à travers une population de cellules cancéreuses, un éventail de cellules ayant chacune leur potentiel génétique à répondre aux signaux de l'environnement (Clark and Vignjevic 2015). Cette composante génétique est particulièrement visible dans les modèles de lignées cellulaires, où le type de migration et les facteurs environnementaux sont limités (Clark and Vignjevic 2015; Lyons, et al. 2008; Weiger, et al. 2013). Par exemple, le groupe de Weiger *et al.* (Weiger, et al. 2013) décrit les différences dans les phénotypes migratoires de quatre séries cellulaires issues de la lignée MCF10A. Ces quatre lignées ont chacune des mutations spécifiques associées à différents phénotypes tumoraux (Kadota, et al. 2010; Marella, et al. 2009; Santner, et al. 2001). Ce groupe discute du rôle des lignées modèles et des essais *in vitro* pour distinguer l'apport des facteurs intrinsèques (génétiques) et des facteurs extrinsèques (microenvironnement) dans les phénotypes migratoires et plus globalement sur le potentiel oncogénique des cellules.

Finalement, en plus du phénotype mésenchymateux, les cellules cancéreuses migrantes peuvent présenter un phénotype amiboïde, plus semblable à la migration des neutrophiles, soit des cellules à forme changeante, migrant rapidement et de manière indépendante aux intégrines et aux protéases dégradant la matrice extracellulaire (Friedl and Wolf 2010; Hecht, et al. 2015; Pankova, et al. 2010; Talkenberger, et al. 2017). Les transitions entre ces modes de migrations sont régulées par la balance dans l'activation de la voie Rac (préconisant la migration mésenchymateuse) et la voie Rho/Rock (migration amiboïde) (Sahai and Marshall 2003). Les deux types migratoires collaboreraient entre eux et le ratio optimal de l'un et de l'autre dépendrait de l'hétérogénéité du substrat rencontré par les cellules (Talkenberger, et al. 2017). En effet, les cellules mésenchymateuses lentes et persistantes dans une direction donnée en réponse à un gradient chimiotactique seraient aptes à frayer leur chemin à travers la matrice et à établir de nouveaux passages pour les cellules amiboïdes. Ces dernières, quant à elles, seraient rapides, moins sensibles à la direction du gradient, mais pourraient avantageusement trouver la source du gradient en testant différentes avenues aléatoirement.

Justificatif

J'ai décrit précédemment deux exemples de migration, soit la chimiotaxie chez les neutrophiles dans le contexte d'inflammation classique et tumorale ainsi que la migration de cellules individuelles dans un modèle de cancer du sein. Ces deux modèles exemplifient des mécanismes communs à toutes les cellules migratrices, chacun mettant en valeur des problématiques spécifiques. Chez les neutrophiles, notons l'émergence de l'haptotaxie comme mode de migration ainsi que la reconnaissance de la plasticité des phénotypes de neutrophiles, particulièrement dans le contexte tumoral. Quant aux cellules cancéreuses elles-mêmes, notons la problématique de l'hétérogénéité phénotypique dans la réponse aux signaux de transition épithéliale à mésenchymale et amiboïde nécessaire à l'émigration vers des niches prémétastatiques.

La section suivante de la revue de la littérature revoit les approches standards d'étude des problématiques de migration cellulaire. Cette section comprend tant une revue des données établies grâce aux essais classiques de migration que les forces et les faiblesses de ceux-ci. S'ensuivent deux sections proposant des solutions d'ingénierie biomédicale aux problèmes

précédemment mentionnés. Ces sections établiront les bases de mon approche, soit : l'utilisation de l'optique dans la fonctionnalisation de substrats ainsi que le traitement d'image dans l'analyse de la migration.

Essai de migration

La diffusion des innovations

Dans la section précédente, j'ai présenté la revue de la littérature portant sur la migration cellulaire. Nous avons acquis ces connaissances grâce à diverses technologies disponibles à travers le temps. Certaines de ces méthodes ont perduré alors que d'autres se sont perdues. En 1962, Rogers Everett établissait les bases de la théorie de la diffusion de l'innovation (Rogers 1962; Rogers 2003). Cette théorie présente l'interconnexion existante entre les besoins technologiques, le développement des technologies et leur diffusion dans la communauté scientifique. La migration cellulaire, comme champs d'expertise, ne fait pas exception à cette théorie. En effet, à travers les époques, plusieurs essais de migrations ont été développés et utilisés. Certains essais simples et développés il y a plusieurs dizaines d'années, comme les chambres à filtres de Boyden (1962), sont encore utilisés aujourd'hui (Majumdar, et al. 2016) alors que d'autres offrent de grands potentiels, telle la microfluidique, mais tardent à se déployer à large échelle (Halilovic, et al. 2015; Lin, et al. 2005; Liu and Lu 2016; Zhang and Nagraath 2013).

Une perspective historique de l'étude de la chimiotaxie des neutrophiles

Les premières observations

Comme mentionné précédemment, c'est à la fin du 19^e siècle que se font les premières observations concernant la migration cellulaire en général ainsi que la caractérisation des différents types de globules blancs (Kaufmann 2008). Mechnikoff observe alors de manière qualitative que les leucocytes migrent vers les bactéries dans les tissus de différentes espèces du règne animal, dont l'homme (Metschnikoff 1887; Metschnikoff 1891). Toutefois, c'est Leber qui a le premier utilisé le terme chimiotaxie (Harris 1954). Au début du 20^e siècle, les premières expériences de migration se limitent à des observations qualitatives de la migration des

leucocytes qui, selon Harris (1954), ne prouvent pas hors de tout doute la chimiotaxie par rapport à d'autres processus. En effet, il cite des études *in vivo* où les leucocytes s'accumulent à un site d'infection, mais argumente que ceci pourrait être due à une perméabilisation des vaisseaux, et non à un mouvement dirigé des leucocytes vers le tissu infecté. C'est avec l'avènement de l'acquisition d'images séquentielles au microscope (« Time-Lapse Microscopy »), qu'on arrive finalement à démontrer la chimiotaxie *in vitro*. On suit les trajectoires des neutrophiles mis en présence de molécules chimiotactiques et on les compare aux trajectoires de cellules soumises à des molécules contrôles (Harris 1954; McCutcheon 1946). C'est dans ces mêmes années que se définissent les premiers paramètres cinétiques représentant la chimiotaxie (McCutcheon 1946). L'index de McCutcheon (Figure 5), appelé aussi simplement l'indice de chimiotaxie ou l'indice de migration frontale (« Forward Migration Index » - FMI), est d'ailleurs toujours utilisé (Rink, et al. 2015; Roy, et al. 2017).

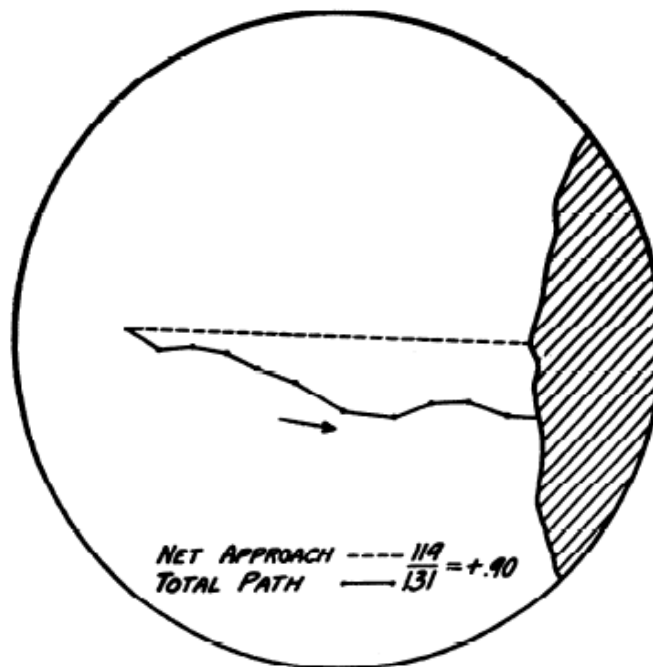


Figure 5. L'indice de chimiotaxie de McCutcheon.

L'indice de chimiotaxie de McCutcheon est défini comme le chemin parcouru dans la direction du gradient (« net approach ») sur le chemin total parcouru (« total path »). Reproduit sans permission nécessaire (McCutcheon 1946).

Les chambres à filtres de Boyden

Dans les années suivantes, Boyden (1962) développe une chambre divisée en deux compartiments superposés et séparés par un filtre aux pores microscopiques (Figure 6b). Une solution chimiotactique est déposée dans la chambre inférieure et diffuse jusqu'à la chambre supérieure. Les neutrophiles peuvent alors suivre le gradient de concentration et migrer vers la chambre inférieure en traversant les pores. Ces chambres sont encore en utilisation aujourd'hui, commercialisées sous différents noms dont Transwell[®], CytoSelect[™], QCM[™] ou encore Cultrex[®] (Boyden 1962; Rigby, et al. 2015; Rot 1993). Elles ont l'avantage de former un gradient stable, comparativement aux jets de pipettes, aux capillaires ou aux morceaux de tissu jusqu'alors utilisés (Harris 1954). Les chambres de Boyden s'adaptent à d'autres types cellulaires, en changeant la taille des pores et en variant les paramètres d'utilisation tels les temps d'incubation ou les substrats. Ce type d'essai sert tant à découvrir de nouvelles molécules chimiotactiques, dont les peptides formylés (Schiffmann, et al. 1975b; Ward, et al. 1968), qu'à démontrer l'impact d'une condition expérimentale sur la chimiotaxie des cellules (Sagiv, et al. 2015; Warden, et al. 1974). Il est intéressant de constater que son utilisation est répandue, non seulement dans la communauté scientifique étudiant spécifiquement la migration, mais également dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire. Toutefois, un désavantage majeur des chambres à filtres de Boyden, lorsqu'utilisées de manière classique, est leur caractère statique, n'offrant pas la possibilité d'explorer la cinétique impliquée dans la chimiotaxie. En effet, par exemple, le groupe de Parent et al. (2013) montre que les phénotypes de migration de cellules cancéreuses diffèrent, lors de l'utilisation d'une chambre de Boyden, de lors de la visualisation de la migration des mêmes cellules par vélocimétrie. C'est seulement par cette dernière approche que le phénotype de migration corrèle avec le pouvoir métastatique des lignées testées. Toutefois, dans le but de visualiser la migration à travers les filtres de Boyden eux-mêmes, certaines avancées technologiques ont vu le jour. Récemment, une équipe a proposé d'utiliser la tomographie par cohérence optique, l'OCT, pour visualiser dynamiquement la migration dans les filtres (Yonker, et al. 2017). Finalement, un groupe a aussi réalisé une chambre de Boyden par microfluidique, dont la transparence permet le suivi dans le temps des paramètres de la chimiotaxie (Zhang, et al. 2016).

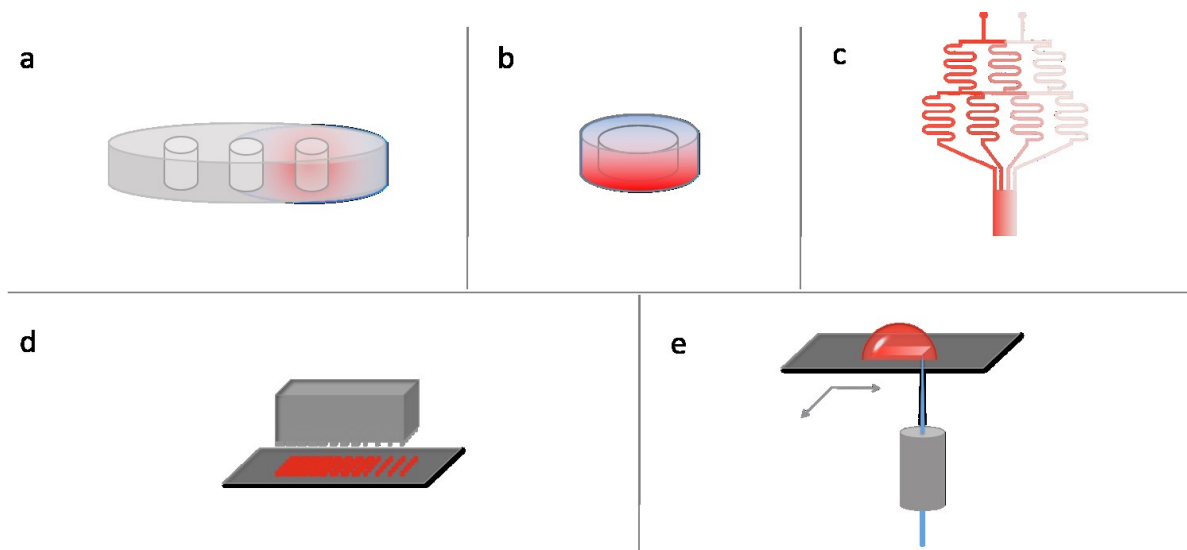


Figure 6. **Principales approches à l'étude de la migration cellulaire.**

Schématisation de certains des essais utilisés pour l'étude de la migration cellulaire. **(a)** chambre sous agarose. **(b)** chambre à filtre. **(c)** chambre microfluidique. **(d)** impression par microcontact **(e)** fonctionnalisation assistée par laser.

Les chambres de migration

En parallèle à l'élaboration et à la diffusion des chambres à filtres, on voit apparaître à partir des années 70s différentes chambres de visualisation de la chimiotaxie. Ces chambres, où s'établit un gradient de concentration contrôlable, permettent la visualisation de la cinétique de la migration (Cutler and Munoz 1974; Nelson, et al. 1975; Zicha, et al. 1991; Zicha, et al. 1997; Zigmond 1977). On les utilise tant pour étudier des paramètres statiques de la migration, tel le front de migration d'une population, (Nelson, et al. 1975) que pour analyser des paramètres cinétiques telles la vitesse ou la direction (Zigmond 1977).

Plus particulièrement, je me permets d'approfondir sur la chambre de migration sous agarose (Figure 6a) puisque cet essai a été retenu pour certaines des approches novatrices présentées dans cette thèse. Développé par Cutler et Munoz (1974) ainsi que par Nelson *et al.* (1975), l'essai consiste en un pétri de culture recouvert d'agarose dans laquelle des puits sont percés pour y déposer des molécules chimiotactiques ou les neutrophiles. Ces derniers, normalement non adhérents sur le fond du pétri de culture, se glissent sous l'agarose dans l'interface entre le fond du pétri et la matrice d'agarose. Cet essai confine les cellules dans l'espace, reproduisant le contexte d'un essai en 3D, où la migration est indépendante des intégrines (Bergert, et al.

2015). En plus de permettre la visualisation de centaines de cellules, il offre l'avantage de contrôler de manière grossière les gradients de concentration. On peut y visualiser la migration de manière statique (« End-Point Assay ») ou cinétique (« Time-Lapse Assay »), tester plusieurs gradients simultanément et étudier la migration soit de cellules individuelles soit d'une population entière. Un groupe a même récemment adapté l'essai en solubilisant dans l'agarose des peptides formylés photomodifiés qui ne lient aux récepteurs que lorsque libérés par la lumière (Collins, et al. 2015). Nous avons choisi cet essai pour les avantages précédemment mentionnés, mais aussi, car il est utilisé par les biologistes depuis des années et jusqu'à aujourd'hui encore (Foxman, et al. 1997; Heit and Kubes 2003; Majumdar, et al. 2016; Nelson, et al. 1975). Les paramètres d'utilisation sont établis et standards, mais l'essai est suffisamment flexible pour nous permettre d'innover tant dans l'analyse automatisée et à grande échelle des trajectoires que dans le design de gradients chimiotactiques.

Les chambres microfluidiques

Dans les dernières années, on a assisté à l'essor de la microfluidique, appliquée à l'étude de la migration (Figure 6c). Une chambre microfluidique est constituée d'un assemblage de canaux de taille microscopique, de forme et de nombre variable, permettant un contrôle spatio-temporel fin des fluides injectés. Les designs de ces canaux sont infinis et donc les potentiels d'applications vastes (Gross, et al. 2007; Kim, et al. 2010; Taylor and Jeon 2010). Ces chambres permettent des prises de mesures très précises et sont adaptées à la culture cellulaire à long terme. Elles sont aussi particulièrement adaptées au contrôle temporel des gradients, car il est possible de varier le type de flux en imposant, par exemple, des vagues de molécules ou un flux pulsé de molécules chimiotactiques. Toutefois, ces chambres sont complexes, étant donné la compréhension de la physique des fluides nécessaire à la maîtrise de la microfabrication des chambres. Communément, elles sont fabriquées par la lithographie douce, par laquelle un polymère (le plus souvent le PDMS) est versé dans un moule créé lequel est gravée la géométrie des canaux et des réservoirs par photolithographie. Cette dernière technique est communément utilisée en électronique pour reproduire des motifs dans la structure d'un matériau grâce à un faisceau lumineux. Le PDMS est alors solidifié et démoulé. Le PDMS se caractérise par sa transparence, sa biocompatibilité et sa non-toxicité, conditions idéales pour la culture cellulaire. Les gradients de fluides sont passifs ou pompés par un système de valves, de pompes externes

ou de capillaires. Comme sa maîtrise est complexe, jusqu'à maintenant, cette technologie reste confinée dans la sphère du génie biomédical et n'a pas été adoptée par l'ensemble des biologistes (Halilovic, et al. 2015; Liu and Lu 2016; Zhang and Nagrath 2013). Ce constat risque de changer puisque, récemment, certaines chambres commerciales de designs limités ont fait leur apparition sur le marché. De la même manière, dans les dernières années, on assiste aussi à une démocratisation de la fabrication des chambres microfluidiques grâce à l'essor de l'impression 3D (Zhou 2017).

La microfluidique a été appliquée à l'étude de la migration des neutrophiles et au diagnostic de pathologies associées à la migration des cellules. Par exemple, le système KOALA, chambre de microfluidique sur laquelle on dépose directement du sang capillaire de patient, a été développé pour le diagnostic de l'asthme. La séparation des neutrophiles se fait sur la chambre, par lyse des globules rouges et capture des cellules sur des marqueurs d'adhésion spécifiques aux neutrophiles (Bastian, et al. 2005; Sackmann, et al. 2014; Sackmann, et al. 2012). Des designs semblables sont encore développés aujourd'hui (Yang, et al. 2018; Yang, et al. 2017).

Une perspective historique de l'étude de la migration des cellules cancéreuses

Les technologies employées pour l'étude de la migration des cellules cancéreuses sont semblables à celles appliquées à la chimiotaxie chez les neutrophiles. *In vitro*, on utilise régulièrement les chambres à filtre de Boyden (Price, et al. 1999; Taraboletti, et al. 1987; Weiger, et al. 2013), différents designs de microfluidique (Boussommier-Calleja, et al. 2016) et même la combinaison de ces deux technologies (Zhang, et al. 2016). Les processus de migration diffèrent entre les cellules cancéreuses et les neutrophiles, menant à des variations dans les essais de migration. Par exemple, comme les cellules cancéreuses adhèrent plus fortement aux substrats que les leucocytes, la chambre de migration sous agarose ne s'applique qu'à ces derniers. De la même manière, les cellules cancéreuses migrent près de dix fois moins vite que les neutrophiles et leur polarité est moins stable (Soon, et al. 2005). Ces considérations sont prises en compte lors de l'élaboration de gradients stables et lors du design expérimental des analyses de cinétique. Dans l'essai d'invasion de surfaces, aussi appelé essai « scratch » ou « wound healing », une population de cellules arrivée à confluence migre vers une zone exempte

de cellules (Justus, et al. 2014; Liang, et al. 2007; Moutasim, et al. 2011). L'essai se réalise en 2D, mais aussi en 3D, et dans ce cas, les cellules doivent digérer ou du moins réorganiser la matrice à envahir. Cet essai est adapté à la migration collective ainsi qu'à la co-culture, ou un type cellulaire favorise la migration ou la propagation d'un autre (Chung, et al. 2009). L'analyse des paramètres de migration collective diffère du suivi des trajectoires de cellules individuelles (Weiger, et al. 2013).

Plus simplement, certains chercheurs produisent aussi des gradients de molécules chimiotactiques par une micropipette reliée à un micromanipulateur et à une pompe (Carmona, et al. 2016; Mouneimne, et al. 2004). Dans une version sophistiquée de cette approche, la chambre de Soon, une lamelle est surélevée au fond d'un pétri, servant ainsi de barrage et produisant un gradient stable et de pente abrupte (Soon, et al. 2005).

Justificatif

Les exemples d'essais mentionnés dans cette section nous montrent qu'il y a un décalage entre les technologies développées et leur utilisation à large échelle par les biologistes étudiant de près ou de loin la migration cellulaire. La liste des techniques mentionnées est non-exhaustive, puisqu'elle n'inclut pas les essais *in vivo*, comme la visualisation des neutrophiles dans la queue des poissons-zèbre (Harvie and Huttenlocher 2015) ou dans le muscle crémaster de la souris (Colom, et al. 2015; Massena, et al. 2010; Xu, et al. 2011). Ont été omis également les essais *in vitro* où la détection n'est pas visuelle, tels les essais basés sur l'impédance électrique (Cano, et al. 2016; Kroon, et al. 2014).

La présente thèse cherche à démontrer qu'on peut réduire cet écart en exploitant le potentiel de technologies déjà adoptées grâce aux technologies émergentes. La biophotonique est une science à la frontière de l'étude du vivant et de la physique optique. La section suivante abordera les applications possibles de la biophotonique aux problématiques de la migration cellulaire. Plus spécifiquement, nous aborderons les méthodes de fonctionnalisation de surfaces, tant les substrats sur lesquels les cellules migrent que la surface même des cellules.

Fonctionnalisation de substrat

La fonctionnalisation de substrat, soit la modification d'une surface ou d'une matrice pour en changer sa fonctionnalité, peut prendre plusieurs formes, dépendamment du substrat ainsi que du type de fonctionnalisation apporté à ce substrat. En biologie cellulaire, les substrats fonctionnalisés sont souvent le plastique, le verre, le métal ou encore l'hydrogel de culture sur ou dans lequel les cellules s'établissent. Certaines des technologies utilisées pour fonctionnaliser ces surfaces sont aussi appliquées à la fonctionnalisation de substrats plus variés comme des billes, des protéines, des liposomes ou encore des membranes cellulaires. Dans le cadre de cette thèse, nous explorerons les méthodes de fonctionnalisation liant des molécules chimiotactiques à des surfaces de culture cellulaire. Enfin, nous explorerons aussi le potentiel de transfert de ces méthodologies à la fonctionnalisation des membranes cellulaires.

L'impression par microcontact

Les essais de migration où les signaux de chimiotaxie sont directement liés à un substrat, les essais d'haptotaxie, ont traditionnellement été développés pour étudier le guidage axonal (Ricoult, et al. 2015; Roy, et al. 2013). La plus commune des méthodes de fonctionnalisation est probablement l'impression par microcontact (Figure 6d). L'idée de base est d'estampiller des motifs de molécules de forme variable et de haute résolution directement sur la surface de culture (Feng, et al. 2004; Perl, et al. 2009; Qin, et al. 2010; Quist, et al. 2005). Les tampons sont gravés à leur surface avec des motifs microscopiques, servant à transférer les molécules d'intérêt. Ceux-ci sont normalement fabriqués en PDMS, puisque ce matériau permet un contact étroit avec la surface à fonctionnaliser. Ils sont réalisés de la même manière que les chambres microfluidiques, soit en utilisant un moule réutilisable fabriqué par photolithographie. Les tampons sont trempés dans la solution à transférer et la surface est estampillée. Les molécules organiques, telles des peptiques, sont adsorbées à la surface, maintenues par des forces de van der Waals, ioniques et hydrophobiques. Dans certains cas, pour s'assurer de la conformation de la molécule d'intérêt et de la force de la liaison, l'adsorption est médiée par un groupement réactif, tel le thiol présent dans les silanes. Dans tous les cas, une attention particulière doit être portée à la conservation des propriétés des molécules ainsi séquestrées à une surface (Ricoult, et al. 2015).

L'impression par microcontact a récemment été appliquée à la problématique de la migration des leucocytes (Girrbach, et al. 2016; Henry, et al. 2015; Lim, et al. 2015; Rink, et al. 2015; Schwarz, et al. 2016; Schwarz and Sixt 2016). Par exemple, Rink *et al.* (2015) ont utilisé l'impression par microcontact d'un hydrogel transférant des gradients de CXCL8 sur la surface de pétri de culture pour étudier l'haptotaxie de neutrophiles. Alors que la méthodologie d'estampillage d'agarose est simple à réaliser, il en résulte un gradient de courte durée induit par la déposition d'une fine couche d'agarose sur le substrat. L'agarose libère la molécule d'intérêt dans le milieu. Le même groupe a aussi utilisé l'impression par microcontact pour immobiliser le CXCL8 sur une surface de verre couverte de groupements thiols (Girrbach, et al. 2016).

Fonctionnalisation assistée par laser

Les lasers ont été utilisés pour fabriquer des surfaces de culture cellulaire modifiées soit en formant des liaisons longues entre de petites molécules ou des protéines et une surface, soit en inactivant des protéines déjà liées à une surface (Adams, et al. 2005; Belisle, et al. 2008b; Heinz, et al. 2011; Herbert, et al. 1997; Hypolite, et al. 1997; Scott, et al. 2012b). En général, la résolution de ces technologies n'est limitée que par la diffraction, c'est-à-dire la taille du faisceau laser à son point focal (Holden and Cremer 2003). Donc, comme les motifs moléculaires ne sont pas imposés par la diffusion ou par des contraintes mécaniques, ils peuvent prendre des formes arbitraires. Les gradients de concentration peuvent s'échelonner sur plusieurs ordres de grandeur (Figure 7). Pendant la fabrication, soit les lasers scannent des surfaces avec une intensité et un temps de rétention variable (Figure 6e) (Belisle, et al. 2008b; Scott, et al. 2012b), soit le motif est projeté à travers un masque (Azioune, et al. 2009; Holden and Cremer 2003), soit encore l'image est générée par une lentille (Belisle, et al. 2009; Nielson, et al. 2009). Ces techniques permettent une excellente précision de la forme du gradient produit et permettent, comparativement à l'impression par microcontact, de produire des gradients de concentration continue. Le principe par lequel les molécules s'attachent à la surface dépend de l'excitation de fluorophores par la lumière du laser. Pendant le photoblanchiment des fluorophores, il y a création de radicaux libres, facilitant l'adsorption des molécules à la surface sous-jacente (Belisle, et al. 2008a). Une version de la fonctionnalisation de surface a été commercialisée sous le nom de Primo par la compagnie Alvéole.



Figure 7. Ramon y Cajal reproduit par fonctionnalisation de substrat

La fonctionnalisation de substrat assistée par laser permet de reproduire à petite échelle des motifs de formes infinies et d'intensité variable. L'image de droite est une reproduction à petite échelle de l'image de gauche, produite par fonctionnalisation du verre avec de la biotine-4-fluorescéine. Le signal a été amplifié avec de la streptavidine-Cy5. Ramon y Cajal est un neurologue connu pour ces travaux sur la migration des axones, appelée guidance axonale. Photo de gauche reproduite sous la licence de Créative Commons. Photo de droite par Joannie Roy.

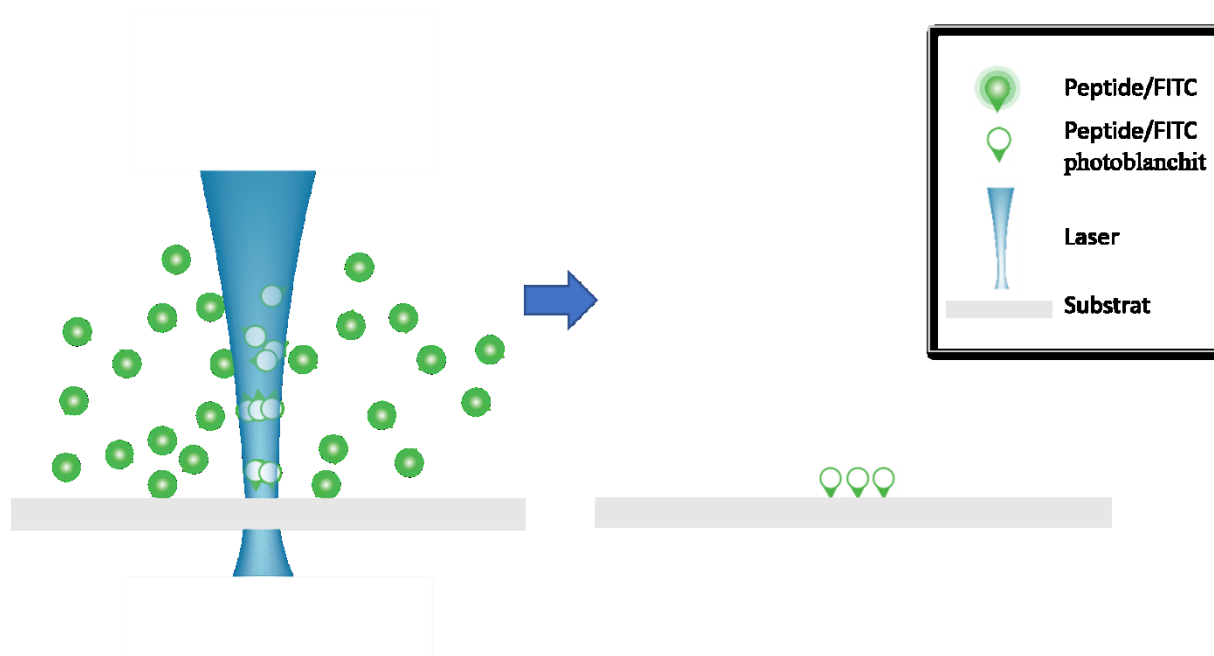


Figure 8. **Fonctionnalisation assistée par laser – LAPAP**

Le LAPAP, de l'anglais « Laser Assisted Protein Adsorption by Photobleaching », consiste à illuminer un laser sur un substrat de culture tel le verre ou le plastique en présence d'un fluorophore excitable à la longueur d'onde d'émission du laser. Lors du photoblanchiment, les radicaux libres induisent des liaisons covalentes entre molécules réactives (schéma de gauche). Lors du rinçage de la solution de fluorophore, les molécules illuminées dans le chemin du laser restent attachées à la surface (schéma de droite).

Fonctionnalisation et isolation de cellules

Dans le cadre de cette thèse, nous appliquons la fonctionnalisation de substrat assistée par laser aux membranes des cellules. Cette technique, le CLaP, semblable à celle décrite précédemment, a été développée dans notre laboratoire (Binan, et al. 2016a; Binan, et al. 2016b). Pour ce faire, une culture cellulaire est immergée dans une solution contenant de la biotine liée à la fluorescéine (B4F). Un groupe de cellules, ou des cellules individuelles sont alors illuminées par un laser excitant la fluorescéine et favorisant ainsi la liaison de la B4F à la membrane cellulaire. Les cellules ainsi fonctionnalisées sont alors fluorescentes, ce qui les différencie des autres cellules environnantes. De plus, le groupement fonctionnel se trouvant à la membrane ouvre la voie pour d'autres applications en aval. Par exemple, la biotine pourrait servir de porte d'entrée à la cellule pour la livraison d'agents actifs ou d'ADN à transfecter, en couplant les

agents d'intérêt à de la streptavidine. De la même manière, la fonctionnalisation à la membrane, liée à un code barres, faciliterait le séquençage de cellules individuelles.



Figure 9. **CLaP**

Représentation schématique de la technique du CLaP, de l'anglais « Cell Labelling via Photobleaching ». La culture cellulaire est incubée avec de la biotine liée à de la fluoresceine. Le fluorophore est excité par un laser, à la localisation et au plan focal de la cellule à fonctionnaliser. Lors du photoblanchiment, les radicaux libres induisent des liaisons covalentes entre molécules réactives (schéma de gauche). Lors du rinçage de la solution de fluorophore, les molécules illuminées dans le chemin du laser restent attachées à la surface du substrat de culture et à la surface de la cellule (schéma de droite).

Plus particulièrement, cette technique nous permet de choisir des cellules d'intérêt et ainsi de les trier des autres afin d'enrichir ce phénotype. Dans la même optique, quelques approches ont été développées dans les dernières années pour isoler des cellules rares (Chen, et al. 2014). Dans tous les cas, ces techniques tirent avantage des caractéristiques différenciant les cellules rares des autres, par exemple la taille, la densité, la morphologie ou la déformabilité. Pour isoler les cellules tumorales circulant dans le sang, les approches sont basées sur la filtration, la microfluidique et d'autres microplateformes de type « lab-on-chip » (Hou, et al. 2013; Tan, et al. 2009; Zheng, et al. 2011). Toutefois, en cours de triage, les systèmes sont rarement couplés à l'imagerie optique.

Parmi les autres approches d'enrichissement à disposition, notons les pinces optiques, où des lasers au foyer confinent une cellule dans l'espace (Landenberger, et al. 2012; Wang, et al. 2011). Celles-ci sont compatibles avec les chambres de microfluidique (Qi, et al. 2017). Toutefois, les pinces optiques sont encore peu utilisées autrement que dans des expériences servant de preuve de concept. Il est intéressant de constater que bien que la microfluidique soit

une technique flexible et en utilisation depuis maintenant quelques années, peu de design incluent des chambres de collection pour les cellules migrantes (Huang, et al. 2011). Il est possible de trier les cellules tirant parti d'une fonctionnalisation de substrats. Communément, lorsqu'on connaît à priori un marqueur d'intérêt, on met les cellules en contact avec un anticorps spécifique à cette signature immunologique. Grâce à l'ajout de billes magnétiques fonctionnalisées pour répondre à ces anticorps, les cellules sont triées à partir d'une population mixte (Lv, et al. 2017).

Traitement et analyse d'image

Survol des méthodes

Le traitement d'image digitale est un vaste champ d'études débutant par la transmission d'images encodées par télégraphe dans les années 1900s et a pris son envol avec l'essor de l'aire spatiale. L'image est considérée comme une fonction à deux variables, soit des coordonnées spatiales et une intensité. Donc, en plus de se représenter visuellement comme un tableau d'intensité, une image est une matrice dont les rangées et les colonnes sont des coordonnées spatiales et dont chaque élément correspondant à un niveau de gris. Les techniques de traitement d'images consistent à faire subir une transformation mathématique à cette matrice, aboutissant soit en une nouvelle image ou en l'extraction de paramètres caractéristiques. Les applications du traitement d'image étant vastes, nous ne considérerons que les aspects de détection automatique des cellules et de suivi des trajectoires. Les techniques de détection de base sont bien expliquées dans le livre Digital Image Processing (Gonzalez c2008).

Détection et segmentation

À la manière de l'œil humain qui sait instinctivement, par exemple, reconnaître des pommes dans un pommier, les algorithmes de détection automatisée des cellules permettent de segmenter ces objets par des critères les différenciant du reste de l'image. Ces critères peuvent être morphologiques, comme la taille ou l'excentricité d'un objet, des contrastes provenant de la réflexion de la lumière ou de la fluorescence ou encore des flux de mouvement d'une image à l'autre. Le choix des critères dépend tant de la nature de l'objet que de la question biologique qui est posée. Le critère différenciant les cellules du fond de l'image influence aussi les

paramètres d'acquisition de l'image, puisque le signal résultant doit être suffisant pour permettre la détection. Les caméras modernes utilisées en microscopie sont munies d'un détecteur à 2 dimensions sensible à la lumière appelée CCD (« Charge-Coupled Device) où est projetée l'image au plan focal de la lentille de la caméra. Le signal détecté est numérisé en nombre entier de 8, 12 ou 16 bits, correspondant à la taille de l'intervalle de niveau de gris possible. Ainsi, une image en 8bit correspond à 2^8 , soit 256, niveaux de gris différents alors qu'une image en 16 bits peut en encoder 2^{16} , soit 65 536.

Avant de segmenter les objets d'une image et donc de les détecter automatiquement, il importe de mettre en évidence les caractéristiques propres aux objets d'intérêt. En traitant l'image, on la filtre par l'application d'une transformation mathématique. Une opération commune d'augmentation du contraste consiste à équilibrer l'image en redistribuant les niveaux de gris réellement mesurés en les étendant sur l'entièreté des possibilités de niveaux de gris. Ainsi les éléments d'un histogramme sont plus éloignés les uns les autres, permettant de les discriminer plus facilement (Hummel 1977).

On peut aussi mettre en évidence des objets d'une image en filtrant le bruit de fond. Les filtres spatiaux s'opèrent directement sur les pixels de l'image, à l'opposé des filtres de fréquence qui nécessitent préalablement de transformer l'image originale en ses composantes fréquentielles. Pour les filtres spatiaux, on utilise une unité géométrique d'une taille définie de pixels, par exemple un carré de 3 pixels sur 3 pixels, qu'on déplace sur l'image par translation pour la transformer. On appelle ces unités des éléments structurants (Figure 10a et b). Dans le cas d'un filtre de moyennage, on remplace la valeur du pixel central de l'élément structurant par la moyenne des pixels de cet élément. Ce type de filtre, lorsque l'élément structurant utilisé est petit, permet de faire disparaître de petits objets d'une image qui corrompent le signal de l'image. L'opération effectuée par ces éléments de structures peut être de toutes sortes. Par exemple, lors d'un filtre gaussien, on remplace la valeur centrale par la moyenne pondérée de cet élément de structure, donnant plus de poids aux pixels centraux.

Une procédure semblable de réduction du bruit de fond consiste à créer une nouvelle image contenant surtout du bruit de fond, et de la soustraire à l'image originale. Ainsi, une image brouillée est créée en promenant un élément structurant plus grand que précédemment, ce qui réduit significativement les transitions d'intensité d'un pixel à l'autre, donc les contrastes de

l'image. En soustrayant cette image résultante à l'image d'origine, on ne met alors en évidence que les éléments de contraste. La subtilité de ces techniques se trouve dans l'optimisation de la taille des éléments structurants et dans le choix des filtres appliqués afin de ne conserver que les éléments d'intérêts.

Il existe aussi des filtres basés sur le domaine fréquentiel d'une image. Jean-Baptiste Joseph Fourier a défini ce domaine stipulant que toute fonction peut être représentée par la somme de plusieurs fonctions oscillatoires ayant chacune un poids (Fourier 1822). Donc, lors d'une transformée de Fourier, on trouve les coefficients associés à chacune des fonctions oscillatoires des deux dimensions de l'image (Cooley and Tukey 1965). Ensuite, sachant la contribution des coefficients de chacune des composantes, on peut filtrer les fréquences pour ne garder que celles contribuant au signal d'intérêt. Par exemple, on sait que la source lumineuse du microscope contribue fortement aux coefficients de basse fréquence d'une image. Pour leur part, les cellules, de taille moyenne, contribuent aux coefficients de moyennes fréquences. Finalement, la granulation à l'intérieur de chaque cellule participe aux hautes fréquences. Ainsi, pour détecter spécifiquement des cellules, on peut appliquer un filtre passe bande favorisant les fréquences moyennes de l'image.

Lorsque le signal provenant des cellules est suffisamment rehaussé, on segmente l'image par différentes approches, telles la recherche de changements abrupts d'intensité ou encore un seuillage d'intensité de gris. Cette dernière méthode, dont l'approche la plus commune est celle d'Otsu (1979), binarise l'image en séparant la distribution des intensités des pixels en deux modes distincts. Otsu calcule tous les seuils possibles et spécifie que le seuil idéal est la valeur pour laquelle la variance à l'intérieur des classes est minimale. Lorsque le fond de l'image n'est pas uniforme, des techniques plus élaborées de seuillage, tenant en compte les variations locales d'intensité, peuvent améliorer la segmentation (Bradley and Roth 2007). Une fois segmentée et binarisée, l'image contient une série d'objets d'intensité 1, entourés du fond de l'image, d'intensité 0.

Cette image binarisée peut être traitée par une série de transformations morphologiques afin d'éliminer les artéfacts détectés par le seuillage, mais qui ne sont pas réellement, par exemple, des cellules. Les deux transformations morphologiques de base sont l'érosion et la dilatation (Maragos 1996; van den Boomgaard and van Balen 1992). Dans les deux cas, on translate un

élément structurant de petite taille sur l'image binarisée (Figure 10). Lors de la dilatation, lorsque le centre de l'élément translaté se superpose avec un objet, la résultante dilatée contient les coordonnées de l'élément. La résultante finale est constituée de l'ensemble des nouveaux objets, où chacun est légèrement plus épais que l'original. Lors de l'érosion, lorsque tous les pixels de l'élément translaté se superposent avec un objet, la résultante érodée contient les coordonnées du centre de l'élément structurant. Dans la résultante finale, chaque objet est donc plus petit que l'original. De plus, si l'élément structurant est plus petit qu'un objet, il ne chevauchera jamais complètement celui-ci. Ainsi, cet objet ne fera plus partie du résultat de l'érosion. Donc, en jouant avec la taille de l'élément structurant, il est possible d'éliminer de petits objets faussement détectés. Finalement, les transformations morphologiques d'ouverture et de fermeture constituent une combinaison séquentielle de l'érosion et de la dilatation. Ces deux transformations adoucissent les objets binarisés. Dans l'ouverture, on procède premièrement à une érosion, suivie d'une dilatation. L'ouverture tend à adoucir les coins des objets et à briser les joints entre deux objets rapprochés. La fermeture, soit une dilatation suivie d'une érosion, pour sa part, tend à fusionner des objets initialement joints par seulement quelques pixels. La combinaison de ces quatre opérations est primordiale lorsque des cellules sont rapprochées les unes des autres et qu'il advient de les distinguer séparément.

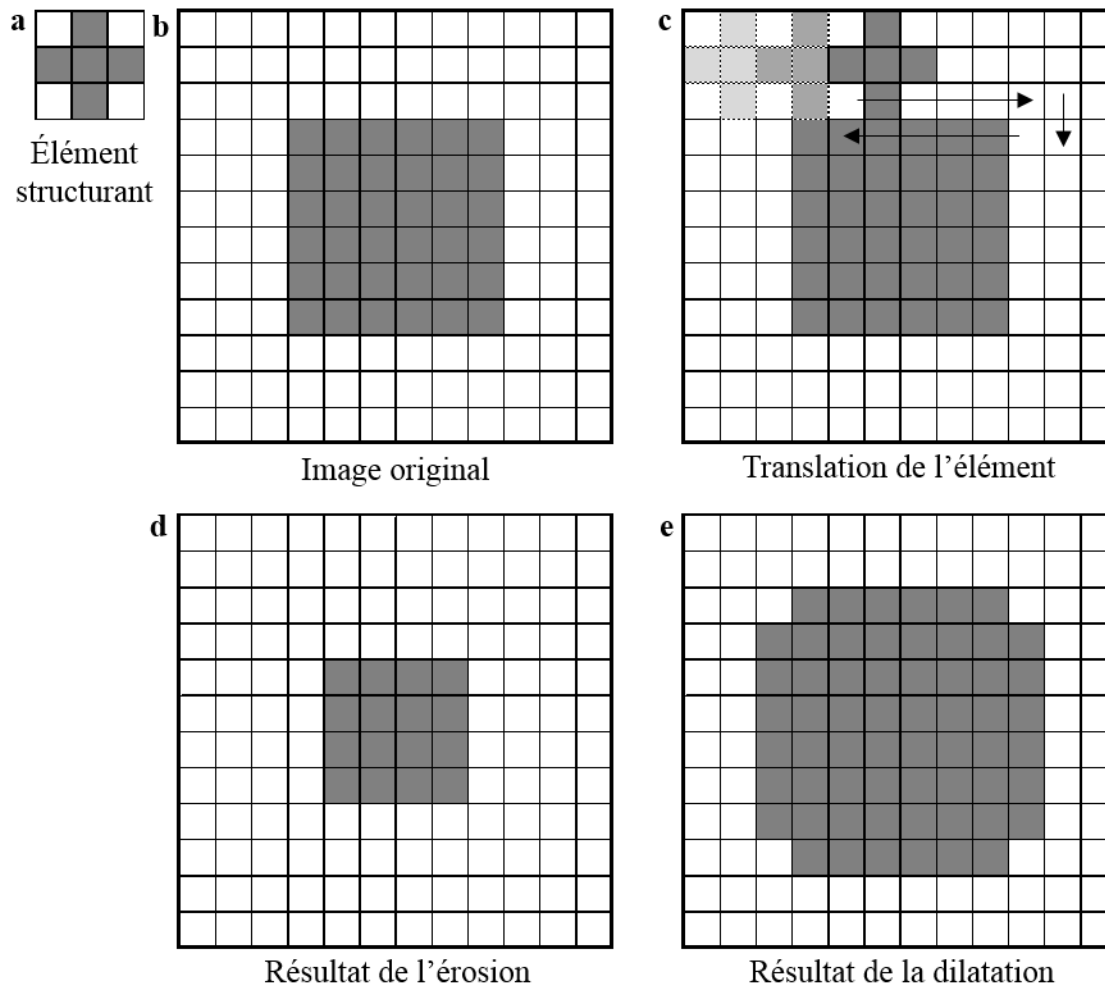


Figure 10. **Transformations morphologiques de base**

Les transformations morphologiques de base consistent à déplacer un élément structurant de taille et de forme définies par l'utilisateur sur une image. Lorsque l'élément rencontre des pixels appartenant à l'objet d'intérêt à transformer, une opération s'effectue. L'érosion résulte en un objet normalement plus petit que l'objet d'origine, alors que la dilatation l'élargie.

Encore une fois dans le but de séparer un objet contenant un groupe de cellules en différents objets distincts, la transformation morphologique par la ligne de partage des eaux (« watershed ») s'avère puissante (Meyer 1994; Vincent and Soille 1991). Dans ce cas, pour chaque objet à sous-segmenter, celui-ci est premièrement représenté comme une carte topographique, considérant les coordonnées spatiales des pixels et où l'intensité de gris originale de l'objet est un relief ou une montagne. Ainsi, les maximums d'intensité d'un objet

correspondent aux sommets d'une montagne. Ensuite, les reliefs sont inversés de sorte à transformer les montagnes en bassins. Pour un objet contenant deux cellules adjacentes, on suppose qu'il y a deux minimums, soit deux bassins. Lors du remplissage de ces bassins imaginaires, la ligne de partage des eaux représente alors les pixels où l'eau est susceptible de couler tant dans un bassin que dans l'autre. Finalement, d'autres approches de détection d'objets, comme l'intelligence artificielle (Gupta, et al. 1990), la visualisation de flux par vélocimétrie (Willert and Gharib 1991) ou encore les modèles de contours actifs (Chan and Vese 2001), constituent des approches alternatives aux méthodes choisies dans cette thèse.

Suivi des trajectoires

Une fois les cellules détectées dans chaque image d'une série temporelle, il importe de retrouver l'identité de chaque cellule d'une image à l'autre. Ainsi, en suivant les cellules dans le temps, on peut tracer leur trajectoire. L'approche la plus conventionnelle de suivi de trajectoire est basée sur l'algorithme du plus proche voisin (« nearest neighbor »). Dans cette approche, on calcule tous les chemins possibles, suivant des paramètres préétablis. La réponse retenue est celle qui minimise la distance globale voyagée par tous les objets. Ainsi, on suppose que les objets proches dans l'espace et dans le temps font partie de la même trajectoire.

Crocker et Grier (Crocker and Grier 1996) ont proposé un algorithme du plus proche voisin où toutes les possibilités combinatoires étaient considérées. En réalité, comme le temps de calcul devient rapidement déraisonnable, ce nombre doit être réduit en imposant un rayon de recherche maximal (mD). L'efficacité d'un algorithme dépend alors de l'optimisation des paramètres de recherche. Cette optimisation requiert une connaissance préalable du système dans lequel les objets évoluent. Ainsi, si les objets ne sont pas distribués de manière homogène dans l'image, comme dans le cas de cellules migrant dans une chambre sous agarose, l'analyse doit alors avoir lieu localement au lieu de globalement. Dans l'annexe 2, nous présentons notre propre algorithme d'adaptation locale ainsi qu'une revue de littérature des alternatives (Mazzaferri, et al. 2015).

Problématique et hypothèses

Problématiques

La revue de la littérature a permis de mettre en lumière les connaissances actuelles en migration cellulaire, en particulier sur la plasticité des phénotypes migratoires des neutrophiles et des cellules cancéreuses migrants individuellement. Nous avons aussi mis en lumière la progression historique des outils utilisés pour étudier la migration. Alors qu'en parallèle, de nouveaux outils sont développés par les ingénieurs, ils ne sont pas toujours utilisés.

Hypothèse centrale

Mon hypothèse centrale postule que les technologies biomédicales de biophotonique telles la fonctionnalisation de substrats et le traitement d'images ajoute à la compréhension de migration cellulaire, par rapport aux approches classiques. Spécifiquement, la plasticité des phénotypes de migrations de neutrophiles et d'une lignée de cancer du sein seront étudiées.

Objectifs spécifiques testant l'hypothèse

Chacun des trois objectifs spécifiques feront l'objet de section de la thèse. Les sections contiennent la méthodologie, les résultats et une discussion. L'hypothèse sera vérifiée si nous obtenons des nouvelles informations sur la plasticité des phénotypes migratoires des cellules étudiés que nous n'aurions pu obtenir par des approches classiques.

Objectif spécifique 1

Concevoir un essai de migration de haut-débit appliqué à l'étude de l'haptotaxie en fonctionnalisant le substrat de migration.

Objectif spécifique 2

Développer un algorithme de traitement d'image appliqué à la chimiotaxie de population polarisée de neutrophiles

Objectifs spécifique 3

Fonctionnaliser les membranes cellulaires de MDA-MB-231 appliqué au tri de cellules individuelles. Fonctionnaliser les membranes cellulaires de MDA-MB-231 afin de trier le phénotype de cellules individuelles.

Description détaillées des objectifs spécifiques

Dans un premier temps, j'ai conçu un essai d'haptotaxie pour les neutrophiles humains. La motivation de ce travail était de déterminer comment les neutrophiles intègrent les signaux spatio-temporels de molécules liées à une surface de culture cellulaire. Bien que l'haptotaxie a été identifiée *in vivo* comme étant un mode essentiel de reconnaissances des signaux de l'environnement, peu d'essais *in vitro* étudient la spécificité de ce processus comparativement à la chimiotaxie classique impliquant des gradients solubles. Afin de tirer le plus d'information sur l'haptotaxie et de s'assurer que l'essai soit adopté par la communauté, celui-ci devait respecter les critères suivants :

- Les caractéristiques du gradient de concentration de molécules chimiotactiques peuvent être modulables.
- La mesure de l'haptotaxie doit se faire dynamiquement dans le temps (« Time-Lapse »).
- Un nombre suffisant de cellules doivent être suivies dans le temps (« high-throughput »).
- Le traitement d'image et l'analyse des trajectoires doivent être automatisés.

Afin d'atteindre ces objectifs, j'ai décidé de tirer avantage de la technique de microingénierie de substrats développée précédemment dans le laboratoire de Dr Costantino, le LAPAP ('Laser Assisted Protein Adsorption by Photobleaching') ainsi que de l'expertise de ce dernier en traitement d'image. J'ai aussi opté pour la modification d'un essai déjà accepté par la communauté, soit la chambre de migration sous agarose, car ce test offrait la flexibilité nécessaire à l'atteinte des objectifs.

Au cours de la conception de l'essai d'haptotaxie, nous avons été approchés par l'équipe de Dr Siegel qui travaillait sur la plasticité des neutrophiles dans le contexte du cancer. Ce groupe cherchait à déterminer si, dans le milieu conditionné provenant de lignées agressives isolées de

métastases, des signaux ciblaient spécifiquement les neutrophiles circulants de phénotype protumoral, les LDNs, comparativement au phénotype antitumoral, les HDNs. La caractérisation de ces phénotypes est très récente et encore peu de groupes de recherche se sont penchés sur les différences fonctionnelles existant entre les LDNs et les HDNs. Dans ce cas, les objectifs à atteindre pour répondre à cette problématique étaient :

- La mesure de chimiotaxie doit se faire dynamiquement dans le temps
- Un nombre suffisant de cellules doivent être suivies dans le temps
- Les conditions expérimentales doivent être testées simultanément (« Multiplex »).
- Le traitement d'image et l'analyse des trajectoires doivent être automatisés

Ainsi, j'ai adapté la chambre de migration sous agarose à un microscope permettant des analyses multiplex. J'ai appliqué mes algorithmes de traitement d'image à ce système. Par ces expériences, nous avons montré une réponse sélective des LDNs au milieu conditionné provenant d'une lignée agressive isolée depuis des métastases de foie. Nous avons identifié un agoniste et un récepteur potentiel propres à ce mécanisme.

Finalement, encore une fois en collaboration avec Dr Siegel et d'autres partenaires, soit les laboratoires de Dr Kleinman, Dr Ursini-Siegel et Dr Ragoussis, nous avons choisi de tester une idée audacieuse. Dans notre groupe, Loïc Binan, dans le cadre de son doctorat, a adapté la technique du LAPAP afin de marquer directement les membranes des cellules au laser. Cette technique, le CLaP, permet d'identifier visuellement des cellules individuelles particulières afin d'en étudier les caractéristiques. Cette approche offre l'occasion d'étudier la plasticité des phénotypes de migration. Dans ce cas, le modèle choisi fut non pas la migration des neutrophiles, mais la migration d'une lignée cancéreuse. Les objectifs étaient les suivants :

- Déterminer l'hétérogénéité intrinsèque des phénotypes de migration d'une population
- Déterminer la variation dans la vitesse et dans la persistance directionnelle
- Déterminer la variation morphologique
- Développer un protocole de migration permettant de marquer et de trier les cellules
- Adapter le protocole de CLaP à la lignée MDA-MB-231 et à la migration cellulaire

- Déterminer l'efficacité du protocole.

Ce dernier projet, à ce stade, est surtout une preuve de concept du potentiel du CLaP à l'étude de la migration cellulaire dans le contexte de formation de métastase. Ensemble, les trois projets permettent de mettre en lumière tant la plasticité des signaux de migration (signaux solubles vs signaux liés aux substrats), que la plasticité dans la réponse aux signaux (réponse sélective selon le phénotype cellulaire) et que la plasticité intrinsèque dans le potentiel de migration (pool génétique d'une population). La thèse décrit donc le rôle de différentes approches émergentes de biophotonique à l'étude de la migration cellulaire.

Section 1. Conception d'un essai d'haptotaxie

Avant-propos

L'essai de chimiotaxie sous agarose a été développé dans les années 1970s. Malgré l'avènement de nouvelles technologies depuis, cette technique est toujours utilisée aujourd'hui et considérée comme un standard. La section qui suit provient directement d'un article que j'ai publié à ce sujet :

**« A Haptotaxis Assay for Neutrophils using Optical Patterning and a High-content Approach » Joannie Roy, Javier Mazzaferri, János G. Filep, et Santiago Costantino
Scientific Reports 2016, 7 : 2869**

L'article propose d'adapter l'essai sous agarose par deux approches : premièrement en le combinant à l'imagerie microscopique en temps réel, deuxièmement en modifiant le substrat de culture par microfabrication au laser pour pouvoir étudier l'haptotaxie. La contribution majeure de cet article à la communauté est la conception d'un algorithme de segmentation et de suivi des trajectoires automatisées. Nous y proposons l'utilisation de nouveaux indices caractérisant la migration. Nous y prouvons aussi que les neutrophiles répondent aux peptides formylés liés au substrat.

J'ai contribué de façon importante à toutes les étapes de la réalisation de cet article. J'ai donc travaillé à la conception du projet (conjointement avec tous les autres auteurs de l'article), à toutes les expérimentations, à l'algorithme de traitement d'images (conjointement avec SC et JM), aux analyses de données (conjointement avec SC et JM) et à la rédaction du manuscrit. (conjointement avec tous les auteurs). Cet article est le cœur de ma thèse.

Méthodologie

Isolation et coloration des neutrophiles

Les neutrophiles humains ont été isolés par l'équipe du Dr János G. Filep, en utilisant un gradient de densité standard de Bøyum (Boyum 1968; Zouki, et al. 1997), avec l'héparine/lithium comme anticoagulant. En bref, le sang veineux provenait de donneurs en

bonne santé qui ont nié la prise de médicament dans les deux semaines précédant le don. L'équipe a vérifié régulièrement l'absence ou la faible activation des neutrophiles en mesurant la chute de L-sélectine, la régulation positive de CD11b ainsi que la formation de superoxyde et de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Les neutrophiles (5×10^6 cellules/ml, pureté supérieure à 96 %, viabilité supérieure à 98 %) ont été remis en suspension dans une solution saline balancée de Hank supplémentée avec 10 % de sérum autologue et leur ADN a été coloré au LDS751 (Molecular Probe) pendant 5 minutes à 37°C. Toutes les expériences ont été réalisées selon les politiques et les protocoles de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Le comité d'éthique de recherche clinique a approuvé le protocole expérimental. Tous les donneurs ont consenti par écrit et de manière informée à leur participation à la recherche.

Fonctionnalisation de substrats de culture (LAPAP)

Nous avons fabriqué des gradients de concentration de molécules liées au substrat de culture en modifiant la méthode optique du LAPAP développée précédemment dans notre laboratoire (Figure 14a) (Belisle, et al. 2008b; Belisle, et al. 2014). Nous avons incubé du formyl-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (fNLFNTK) couplé avec le fluorophore FITC (fNLFNTK/FITC, Molecular Probe) à une concentration de 0.5 mg/ml sur des pétris de culture montés d'une lamelle de verre (MatTek). Comme contrôle négatif, nous avons incubé le même peptide, mais dans sa forme non formylée (H_2N -Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys/FITC, New England Peptide). Les peptides sont liés de manière covalente à la surface de verre en illuminant un laser émettant à 473 nm, (largeur de faisceau d'environ 1 mm avant la lentille) focalisé à l'aide d'une lentille de longueur focale de 38 mm. Nous avons choisi la longueur d'émission du laser pour qu'elle corresponde au spectre d'absorption de la molécule FITC, permettant ainsi son photoblanchiment. Les radicaux libres générés lors du photoblanchiment favorisent la liaison covalente du peptide à la surface. Nous avons produit les gradients de concentration en variant la puissance du laser entre 40 μ W (condition minimale expérimentale pour l'adsorption) et 400 μ W (saturation de l'adsorption). Nous avons varié la forme du motif peptidique en déplaçant l'échantillon sur une plateforme motorisée contrôlée par le logiciel de programmation LabVIEW (National Instruments) à une vitesse de 0.1 mm/s.

Fonctionnalisation de CXCL8

Des motifs de CXCL8 ont été réalisés indirectement en attachant à un motif de biotine-4-fluorescéine (B4F, Sigma Aldrich) de la streptavidine (Sigma Aldrich) et du CXCL8 recombinant humain (BioBasic) préalablement biotinylé. Les motifs de B4F ont été créés de la même manière que les motifs de fNLFNTK/FITC. Comme contrôle, nous avons aussi créé des motifs négatifs en omettant la streptavidine, le CXCL8 ou la streptavidine et le CXCL8.

Nous avons biotinylé la chimiokine en la mélangeant avec de la biotiny-N-hydroxy-succinimide (EZ-Link™ NHS-Biotin, Thermofisher) dans un tampon alcalin afin de créer des liens amides stables sur les groupements amines primaires. Le mélange a été purifié par dialyse dans du PBS pour retirer le surplus de biotiny-N-hydroxy-succinimide n'ayant pas réagi (Puralyzer midi 3500, Sigma).

Afin de confirmer liaison de la biotine au CXCL8 et celle du complexe (B4F)-streptavidine-(CXCL8-biotine), nous avons révélé la présence de CXCL8 par la méthode d'ELISA. Des motifs de CXCL8 et différents contrôles ont été incubés avec un anticorps de souris anti-CXCL8 humain (51-26541E, BD Biosciences) à une dilution de 1 : 250, suivi d'une incubation avec un anticorps contre la souris lié au HRP à une dilution de 1 : 2000 (31430, Invitrogen). Nous avons révélé la réaction avec le substrat chromogène OPD et lu l'absorbance à 490 nm avec un lecteur de plaque (BioTek).

Préparation des pétris d'agarose

Des pétris de culture montés d'une lamelle de verre ont été préalablement incubés avec de l'albumine bovine (BSA) 3 % pendant 15 minutes et rincés trois fois avec du PBS. Cette passivation réduit les liaisons peptidiques non spécifiques et favorise l'adhérence des cellules au substrat. Pour les essais d'haptotaxie, nous avons fabriqué les motifs peptidiques sur cette surface avant d'y verser l'agarose. Nous avons chauffé de l'agarose à faible point de fusion (UltraPure) dans une solution saline de Earle (EBSS, Gibco) à une concentration de 4.8 % et dilué cette solution mère à une concentration finale de 1.2 % dans du milieu RPMI 1640 (10 % de FBS). L'épaisseur finale de la couche d'agarose mesurait environ 3 mm afin qu'une fois trouée avec un poinçon à biopsie de 2 mm, le volume des puits soit de 10 µl. Pour les essais

d'haptotaxie, le puits a été aligné de manière à exposer une section du motif peptidique (Figure 14b, panneau de gauche). Pour la majorité des expériences de chimiotaxie classique en diffusion (Figure 14b, panneau de droite) sur les neutrophiles humains, nous avons utilisé une solution de fNLFNTK/FITC dilué dans le RPMI 1640 (10 % FBS) à une concentration de 200 nM. Certaines expériences ont été réalisées avec du CXCL8 ou CXCL8-biotine à 1 nM. Les solutions ont diffusé dans le gel 15 minutes, générant un gradient de concentration stable, avant que ne soient déposés les neutrophiles.

Acquisition d'images

Typiquement, les neutrophiles humains fluorescents ont été photographiés toutes les 5 secondes pendant une période de 2 heures en allumant la source lumineuse pendant 100 ms à une puissance de 300 μ W avec un filtre de bande d'excitation de 542 à 582 nm et de bande d'émission de 603 à 683 nm. C'est un programme LabView développé au laboratoire qui contrôlait la caméra à CCD (Retiga), la source lumineuse et la plateforme motorisée d'un microscope inversé (Olympus IX71) équipé d'un objectif 10X. Tout au long de l'acquisition d'images, nous avons maintenu les neutrophiles à 37 °C et à 5 % CO₂ grâce à un incubateur (Tokai Hit) fixé à la plateforme du microscope.

Détection et suivi des trajectoires

Nous avons développé un script MATLAB (MathWorks,) pour l'analyse d'image, la détection des cellules, le suivi et l'analyse des trajectoires générées. La détection des neutrophiles était basée sur une estimation de l'intensité du bruit en appliquant une ouverture morphologique sur l'image originale à l'aide d'un élément structurant circulaire du double du diamètre d'un neutrophile type. Nous avons ensuite soustrait ce bruit de fond calculé à partir de l'image originale et nous avons aussi appliqué un filtre à bande passante pour accentuer les éléments de la taille de neutrophiles (Crocker and Grier 1996). Nous avons défini la position d'une cellule comme étant le pixel de plus haute intensité dans une région définie par un seuil établi par la méthode de Otsu (Otsu 1979). La pureté des préparations cellulaires était en moyenne de 96%. La présence d'autres polymorphonucléaires, comme les éosinophiles, est considérée négligeable.

Nous avons déterminé les trajectoires des cellules par une approche des plus proches voisins (« Nearest-neighbor »), où l'on minimise globalement la distance totale liant les objets des trajectoires. Nous avons modifié l'algorithme de u-track (Jaqaman, et al. 2008b) en optimisant localement le rayon de recherche maximal par un calcul de la moyenne spatio-temporel (Mazzaferri, et al. 2015).

Détermination de la sensibilité de la détection

Afin de déterminer la sensibilité de la détection des neutrophiles, nous avons acquis un jeu de données de 300 images sur 20 minutes, alternant entre la fluorescence et la transmission. Les valeurs de référence, soit les coordonnées des vraies cellules, étaient déterminées manuellement pour chacune des images en se basant sur le jeu de données en transmission. Nous avons calculé la sensibilité en divisant le nombre de cellules adéquatement détectées par image par la valeur de référence.

Analyse du tenseur de giration

Nous avons calculé le tenseur de giration afin d'analyser les dynamiques de migration cellulaire (Figure 11). Nous avons analysé l'évolution du rayon de giration R_g , qui provient du tenseur de giration, en fonction du temps (Saxton 1993). Le tenseur est défini comme suit :

$$T = \begin{pmatrix} T_{xx} & T_{xy} \\ T_{xy} & T_{yy} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2 & \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle \\ \langle xy \rangle - \langle x \rangle \langle y \rangle & \langle y^2 \rangle - \langle y \rangle^2 \end{pmatrix} \quad (\text{Eq. 1})$$

où x et y sont les coordonnées de la position cellulaire et l'opérateur $\langle \rangle$ indique la moyenne temporelle. R_g mesure l'étalement spatial des positions cellulaires dans une même trajectoire. Il est calculé comme suit :

$$R_g^2 = R_1^2 + R_2^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

où

$$R_1^2, R_2^2 = \frac{1}{2} [(T_{xx} + T_{yy}) \pm \sqrt{(T_{xx} - T_{yy})^2 + 4T_{xy}^2}] \quad (\text{Eq. 3})$$

sont les valeurs propres de T .

Une faible valeur de R_g indique une période statique pour la cellule, puisque les positions de celle-ci se localisent aléatoirement autour d'un même point. Au contraire, durant la migration, la cellule s'éloigne de son origine, menant à de plus grandes valeurs de R_g . Nous avons normalisé par le temps le carré du rayon de giration $R_{gN}^2(t)$ comme suit :

$$R_{gN}^2(t) = \frac{\sum_{\tau=t}^N R_g^2(\tau)}{N-t} \quad (\text{Eq. 4})$$

et divisant cette valeur par le nombre d'images dans la séquence utilisée pour le calcul. Lorsque la valeur de R_{gN}^2 passait sous un seuil préétabli, la cellule était qualifiée de statique.

De plus, le paramètre A_2 , qui provient du tenseur T , décrit l'élongation de la trajectoire :

$$A_2 = \frac{(R_1^2 - R_2^2)^2}{(R_1^2 + R_2^2)^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Donc, une valeur de A_2 proche de 1 représente les trajectoires allongées, tandis qu'une valeur de A_2 proche de 0 indique des trajectoires aléatoires. La moyenne temporelle pour le A_2 a été calculée comme pour l'équation 4.

Lorsqu'il est mentionné dans le texte, nous avons tronqué les segments statiques des trajectoires avant de calculer d'autres paramètres. Le seuil établi pour tronquer les segments était de $R_{gN}^2 < 0.1 \mu\text{m}^2$ et $A_2 < 0.6$.

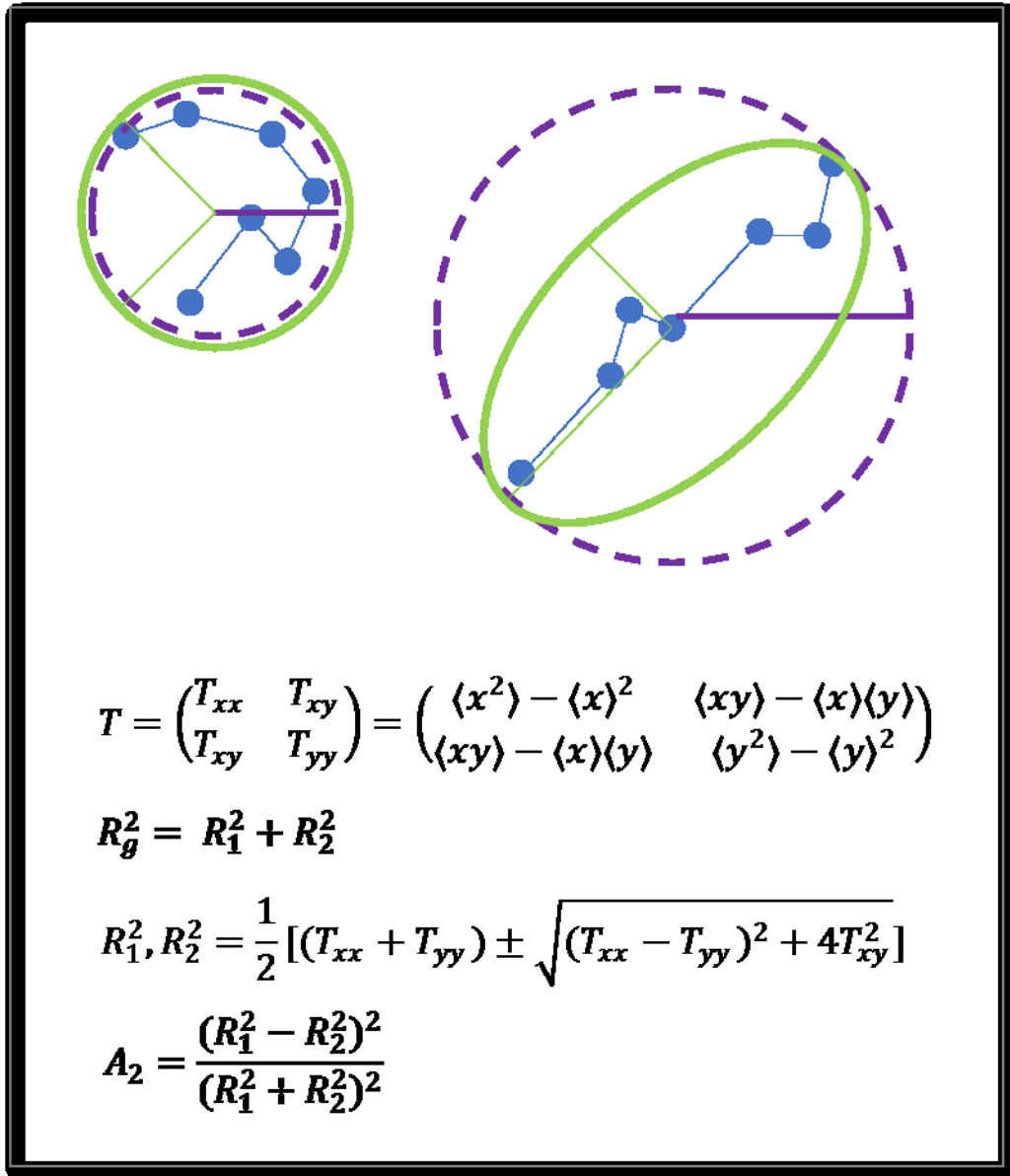


Figure 11. Tenseur de giration

Représentation schématique du rayon de giration (*en mauve*) et du paramètre A_2 (*en vert*) autour de nuages de points des pas d'une trajectoire aléatoire (*à gauche*) et d'une trajectoire dirigée (*à droite*). Chaque pas est représenté par un point bleu et relié au prochain pas par un trait bleu. Pour une durée équivalente, la trajectoire aléatoire de gauche possède un rayon de giration au carré plus petit que la trajectoire dirigée. Le paramètre A_2 est proche de 0 pour la trajectoire aléatoire et près de 1 pour la trajectoire dirigée.

Indices de chimiotaxie

L'indice de migration frontale *FMI* (« Forward Migration Index »), l'indice de migration latérale *SMI* (« Side Migration Index »), la longueur totale l_i , la précision dans la direction *DI* (« Directness ») et l'indice de précision chimiotactique *CPI* (« Chemotactic Precision Index ») ont été calculés suivant une terminologie préalablement définie () (Rink, et al. 2015) :

$$FMI = \frac{y_{end}-y_1}{l_i} \quad (\text{Eq.6})$$

$$SMI = \frac{x_{end}-x_1}{l_i} \quad (\text{Eq.7})$$

$$DI = \frac{((x_{end}-x_1)^2 + (y_{end}-y_1)^2)^{1/2}}{l_i} \quad (\text{Eq. 8})$$

où

$$l_i = \sum_{i=2}^{n_{steps}} ((x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2)^{1/2} \quad (\text{Eq. 9})$$

et

$$CPI = \frac{FMI^2}{directness} \times (1 - |SMI|) = FMI \times \cos^2 \phi \times (1 - |SMI|) \quad (\text{Eq. 10}).$$

où ϕ est l'angle entre le FMI et D. Afin de comparer l'essai classique en diffusion et l'essai d'haptotaxie, nous avons défini la direction frontale comme étant l'axe radial du puits, ignorant la direction du gradient lié au substrat.

Nous avons calculé la vitesse moyenne d'une trajectoire en divisant la longueur de la trajectoire totale par le temps total écoulé. La vitesse instantanée de la cellule à chacun des pas de la trajectoire a été calculée en divisant la longueur d'un pas par le temps écoulé entre deux images. Afin d'évaluer l'impact de l'orientation de la cellule sur sa vitesse, nous avons aussi mesuré l'angle entre la direction du gradient immobilisé et la direction des pas d'une trajectoire.

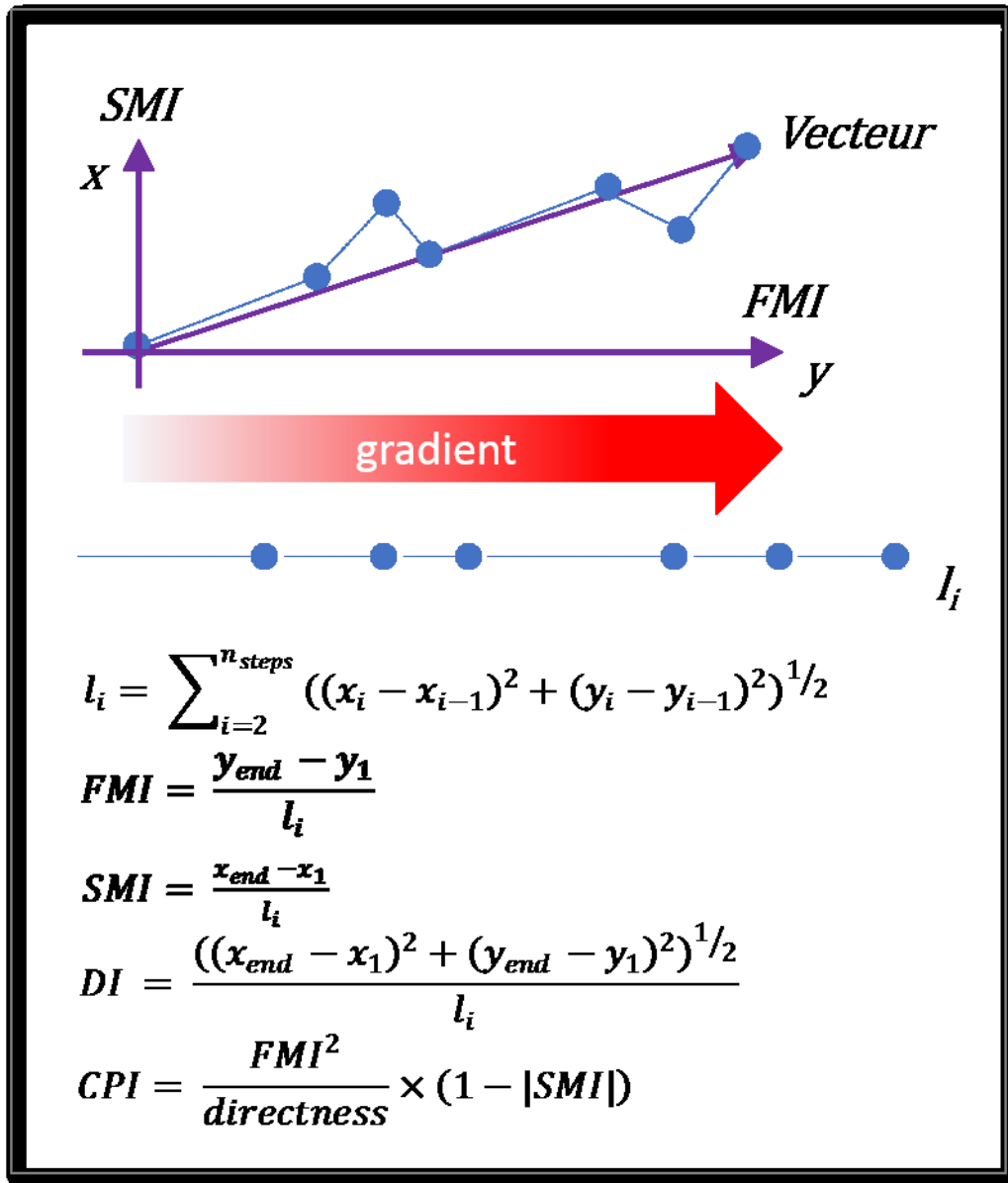


Figure 12. **Indices de chimiotaxie**

Schématisation des indices de chimiotaxie utilisée. Chaque pas de la trajectoire est représenté par un point bleu et relié au prochain pas par un trait bleu. L'indice de migration frontale FMI représente la distance parcourue dans la direction du gradient. L'indice de migration latérale SMI représente la distance parcourue perpendiculairement à la direction du gradient. La longueur l_i est l'addition de chaque longueur de pas.

Paramètre de pénétration

Nous avons déterminé la quantité de cellules entrant par minute dans l'interstice entre le verre et l'agarose en présence d'un motif peptidique lié au substrat de culture. Pour ce faire, nous avons compté, à des intervalles de temps constants, les trajectoires initiées près du rebord du puits (moins de 100 μm du bord), d'une durée d'au moins 25 secondes et suffisamment allongées ($R_g^2 > 40 \mu\text{m}^2$). Nous avons normalisé le paramètre de pénétration par l'aire occupée par le motif.

Quantification du LAPAP

Nous avons estimé le nombre de molécules des motifs peptidiques liées au substrat de culture en utilisant une courbe de calibration de la fluorescence émise par les molécules de streptavidine-CY5. Pour créer la courbe de calibration, nous avons fabriqué une chambre en coin à l'aide d'une lame de microscope montée d'une lamelle de verre, comme illustré à la **Error! Reference source not found.** Nous avons rempli la chambre avec des solutions de concentration variable de streptavidine-CY5 et avons photographié la chambre en la balayant à divers endroits en conservant les mêmes paramètres d'illumination d'une image à l'autre. Nous avons évalué la hauteur de la chambre au niveau de chaque région photographiée grâce à la vis micrométrique du microscope. Connaissant la dimension de la chambre et la concentration d'une solution donnée, nous avons calculé le nombre de molécules de streptavidine-CY5 pour une aire donnée, et corrélié ce nombre à la fluorescence émise pour cette aire, telle que captée par la caméra. Nous avons ensuite mesuré la fluorescence émise par un motif de B4F saturé et recouvert de streptavidine-Cy5 et extrapolé, grâce à la courbe de calibration, le nombre de molécules immobilisées sur le substrat, par unité de surface. Connaissant le poids moléculaire de la streptavidine-Cy5 (60kDa), nous avons converti la masse de 23.67 pg/mm^2 à 23 770 molécules par 100 μm^2 .

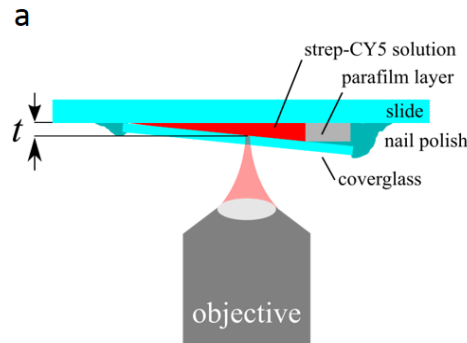


Figure 13. **Quantification du LAPAP**

Schéma de la chambre en coin utilisée pour calibrer les solutions standards de Streptavidine-Cy5. La chambre consiste en une lame de microscope montée d'une lamelle où l'un des cotés est surélevé par du parafilm. La chambre est remplie de solution de streptavidine-C5. La hauteur (t) de la chambre est calibrée par la microvis du microscope. Les mesures de fluorescences ont été effectuées à différentes hauteurs.

Analyses statistiques

Sauf lorsque c'est précisé, les données présentées sont des valeurs moyennes \pm écarts-types. Nous avons utilisé le test de Student et le test U de Mann-Whitney pour comparer les groupes. Pour les corrélations, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Pearson (r). Une valeur de $p < 0.05$ était considérée comme statistiquement significative. Pour l'histogramme de la **Error! Reference source not found.**e, les barres d'erreur ont été calculées en se basant sur la propagation de l'incertitude. Nous avons donc utilisé la racine carrée du nombre d'événements et présumé que la distribution des événements dans chaque classe respectait une distribution de Poisson (Bevington 1992).

Résultats

Approche de contenu massif

Nous avons développé une approche novatrice de traitement massif des données pour un essai d'haptotaxie basée sur l'essai bien établi de chambre de migration sous agarose (Figure 14). Dans cette approche, nous contrôlons la caméra, la source lumineuse et la plateforme du

microscope motorisée afin d'acquérir plusieurs séries d'images en parallèle. Nous utilisons ensuite des algorithmes automatisés pour suivre les trajectoires de milliers de neutrophiles humains fluorescents (Film 1 et Film 2)¹. Pour éviter la phototoxicité tout en détectant et suivant les cellules avec précision, nous avons prudemment choisi les conditions minimales d'exposition lumineuse. Nous avons ajusté ces paramètres en recensant les signes de phototoxicité tels les changements morphologiques des neutrophiles de la forme amiboïde vers une forme arrondie (Film 3).

Fonctionnalisation de surface

Nous avons modifié l'essai classique de chambre de migration sous agarose, dans lequel normalement les cellules migrent vers un gradient soluble de molécules chimiotactiques, pour le transformer en essai d'haptotaxie (Figure 14b). Nous avons utilisé la micro-ingénierie pour lier à la surface de culture un gradient peptidique formylé et modifié avec de la fluorescéine. La technologie appliquée, le LAPAP, consiste à déplacer un échantillon contenant des fluorophores sur un laser afin de lier ceux-ci à la surface sous-jacente lors du photoblanchiment des fluorophores ainsi excités. Le gradient est produit en variant la puissance du laser et sa géométrie est imposée par le déplacement de l'échantillon sur la plateforme motorisée (Belisle, et al. 2008a) (Figure 14a). Nous avons conçu des gradients de pentes constantes et continues correspondant à une différence dans la concentration peptidique de 4 % (pente douce) et 8 % (pente abrupte), sur la longueur d'une cellule typique de 10 μm (Figure 15). À la saturation, nous avons estimé que ce type de gradient représente 2.4×10^4 molécules perçues sur une surface équivalente à une cellule (Figure 16). Les dimensions du motif peptidique sont telles que plusieurs longues trajectoires cellulaires peuvent être suivies lors d'une expérience (Figure 17a). Après une migration de deux heures sur ces motifs peptidiques, nous avons détecté une corrélation positive entre la densité de cellules à une position donnée et la concentration de peptides formylés ($r = 0.97$, $p = 0.0078$) (Figure 17b et c et Film 2). Il n'y a pas de telle

¹ Tous les films de cette thèse peuvent être visionnés en suivant ce lien : <http://biophotonics.ca/Videos/>
Les légendes des films se trouvent après la section méthodologie.

corrélation lors des essais contrôles de motifs peptidiques non formylés ($r = 0.53$, $p = 0.3554$) (Figure 17b et d).

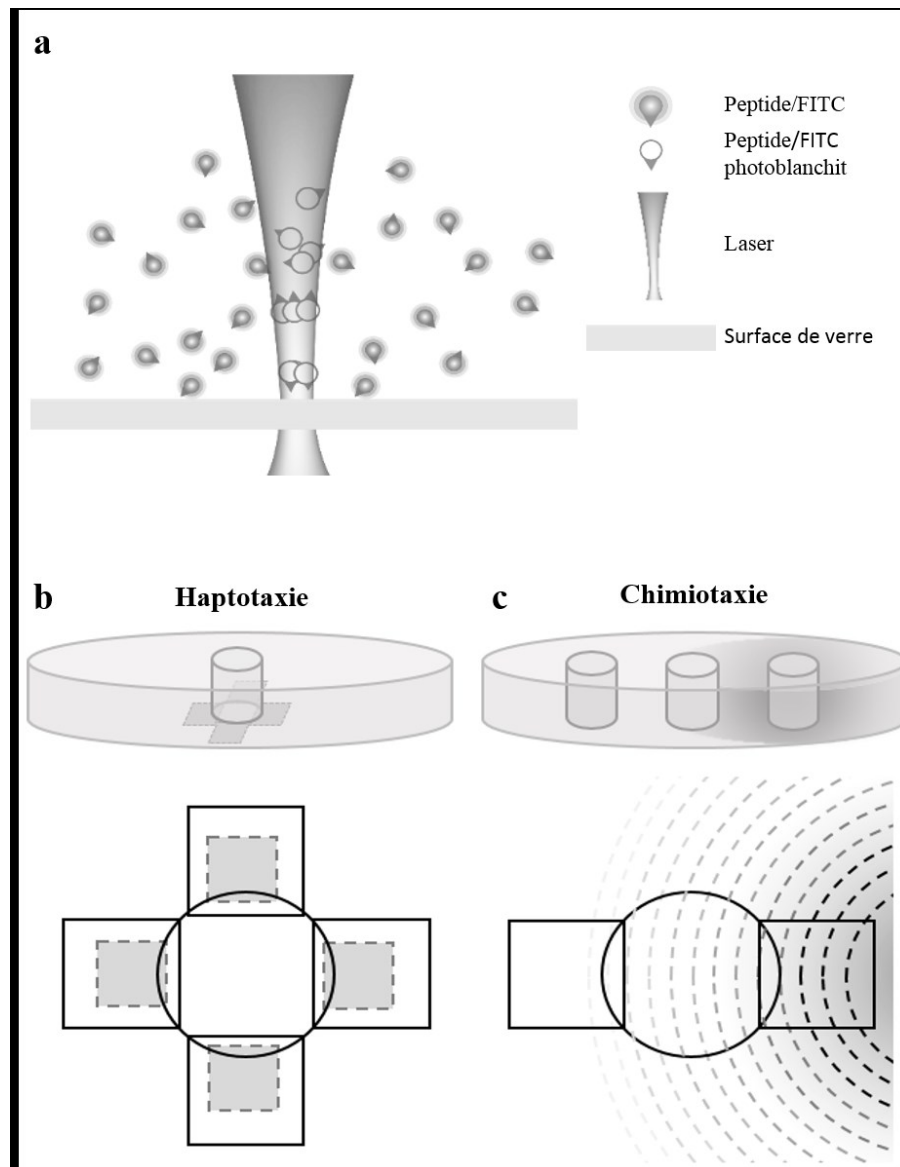


Figure 14. **Schéma du LAPAP et des essais de migration sous agarose.**

(a) Fonctionnalisation du substrat par LAPAP. La surface de verre est incubée avec un peptide lié à la fluorescéine. Un laser focalisé à la surface photoblanchit les molécules, les liant à la surface. (b et c). Vue latérale et en plongée des puits d'agarose (35 mm \varnothing) et des puits (2 mm \varnothing). Les cadres noirs représentent les différents champs alternativement photographiés grâce à une plateforme motorisée. (b) Haptotaxie. Les gradients de concentration peptidiques (carrés ombragés) sont liés à la surface du puits. Le puits central est aligné sur les gradients. (c) Chimiotaxie. Un puits latéral est rempli de solution chimiotactique et le puits latéral opposé d'une solution contrôle.

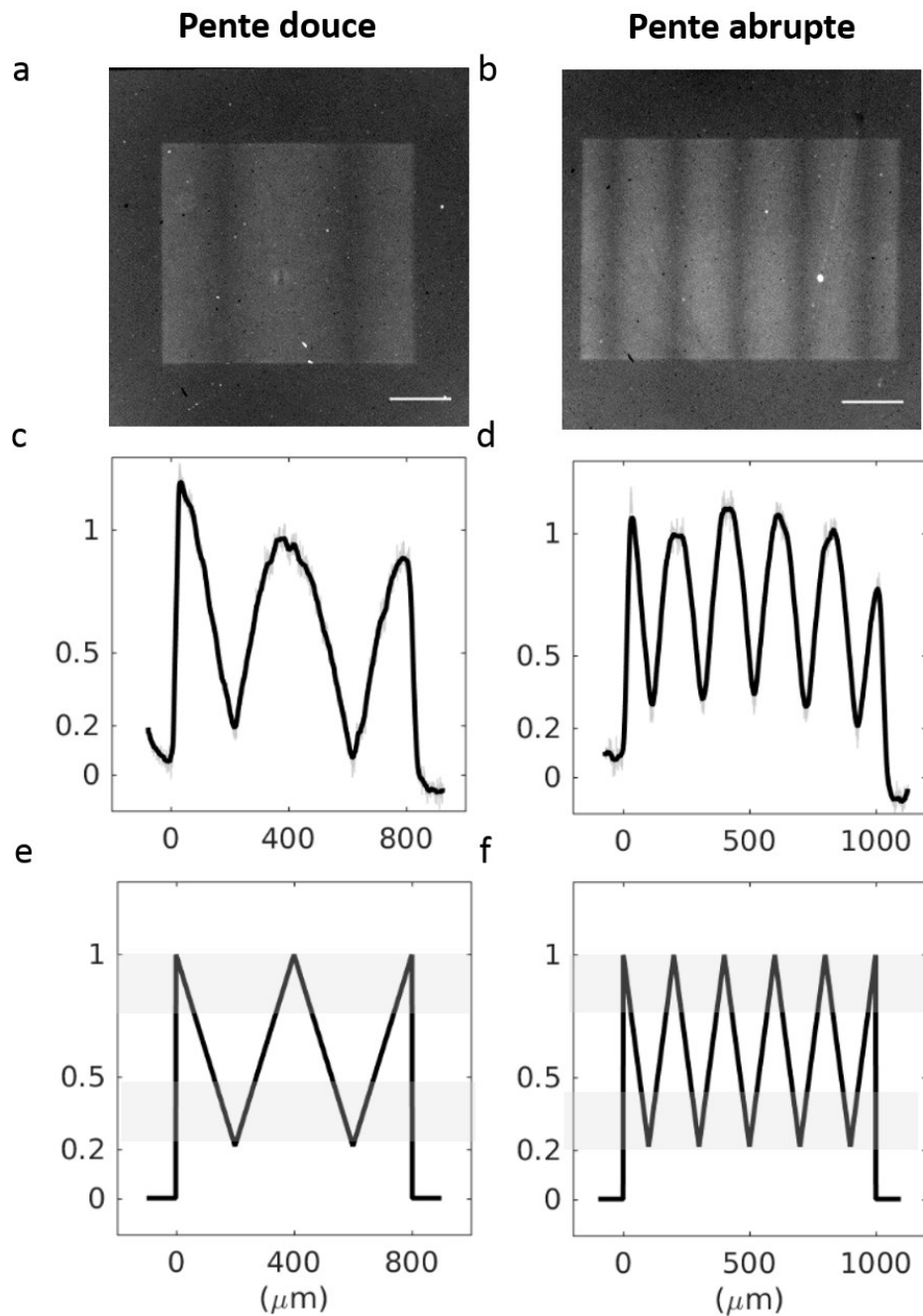


Figure 15. **Caractérisation des gradients de peptides formylés liés au verre**

(a, c, et e) Gradient à pente douce. (b, d et f) Gradient à pente abrupte. (a et b) Images en microscopie à fluorescence de gradients typiques. Échelle : 200 μm (c et d) Profils d'intensité de fluorescence normalisée. En gris ; données brutes. En noir ; données lissées par un filtre de moyennage. (e et f) Géométrie des gradients modèles. Les zones grisées représentent les parties des gradients les 30 % plus ou moins concentrées.

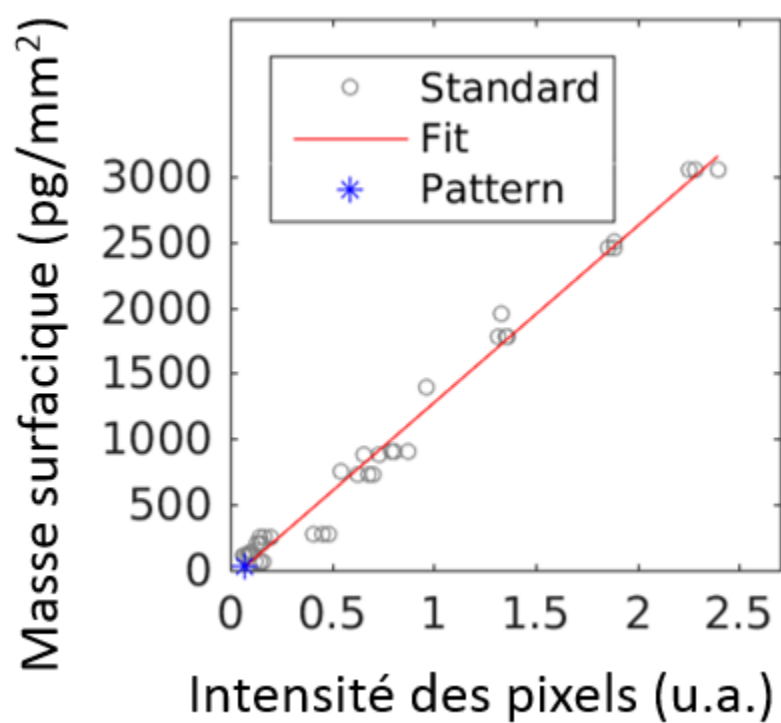


Figure 16. **Quantification des molécules liées à la surface**

Courbe de calibration (« Fit ») utilisée pour calculer la masse surfacique d'un motif (« Pattern ») saturé en molécules.

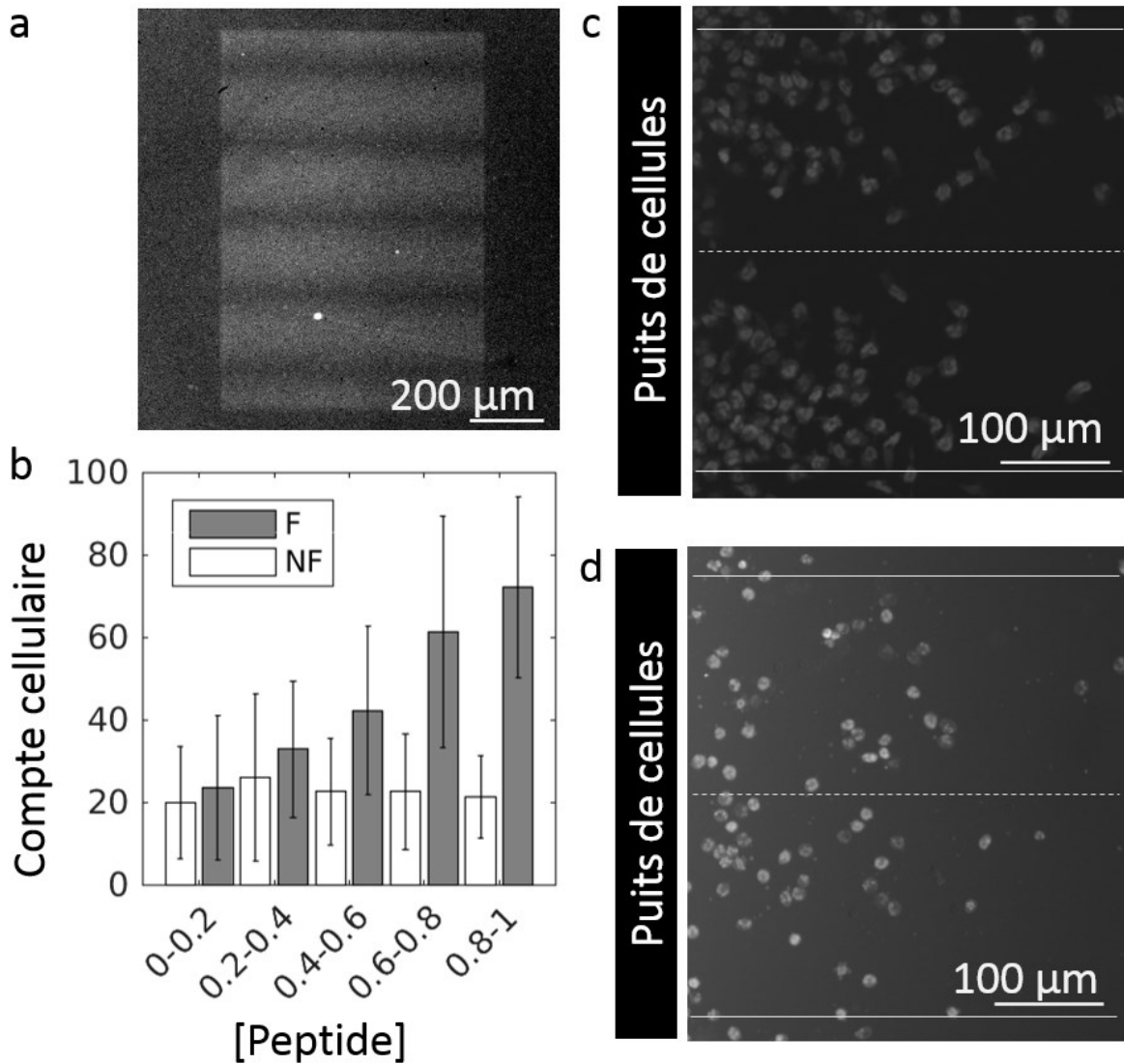


Figure 17. **Migration sur un gradient de peptides liés à un substrat**

(a) Image en fluorescence d'un gradient typique (b) Compte cellulaire absolu pour des intervalles de concentration croissante de NLFNTK-FITC formylé (F) ou non formylé (NF). $N = 3$. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type. (c et d) Positions des neutrophiles sur des motifs peptidiques formylés (c) ou non formylés (d) de NLFNTK-FITC après 2 heures de migration. Les lignes pointillées représentent les minimums de concentration du gradient et les lignes pleines, les maximums.

Détection et suivi des trajectoires

Nous avons analysé les données acquises pendant les expériences de manière séquentielle. Dans la phase de prétraitement des images, la géométrie exacte du gradient est enregistrée. L'algorithme de détection des cellules consiste premièrement à une étape de renforcement de caractéristiques types (« Feature Enhancement »), augmentant le signal, suivi d'une étape de détection des objets (Figure 18). Les caractéristiques types sont enrichies en soustrayant à l'image originale l'image d'arrière-plan (« Background ») qui est calculé en effectuant une opération d'ouverture morphologique et en appliquant un filtre de fréquences. L'objet est détecté en localisant les régions de hautes intensités. Notre approche permet de détecter les cellules avec une sensibilité moyenne de 79.3 %. Nous avons suivi les trajectoires par une méthode qui s'adapte dynamiquement à la densité locale des cellules dans une région donnée de l'image (Mazzaferri, et al. 2015). En moyenne, nous avons détecté 148 580 pas de trajectoire par expérience (Tableau I). Typiquement, une trajectoire suivie s'étend sur une longueur moyenne de 109 μm avant que la cellule ne s'arrête ou que la trajectoire ne soit tronquée par l'algorithme de suivi. Nous avons obtenu une moyenne de 2133 trajectoires détectées par essai et une vitesse moyenne de migration de 10-20 $\mu\text{m}/\text{min}$.

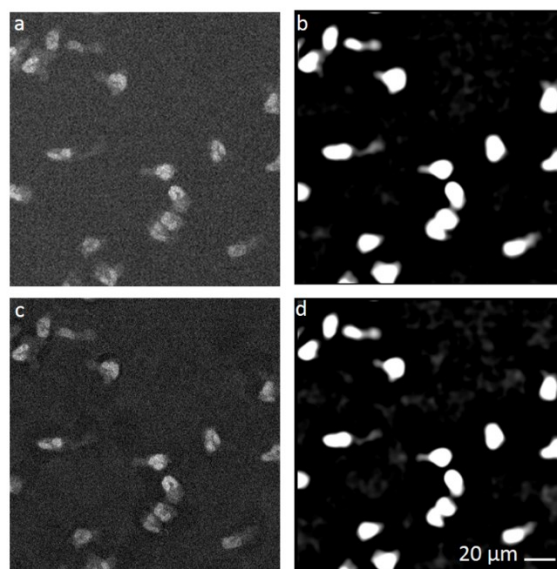


Figure 18. **Détection des cellules par enrichissement des caractéristiques types**

(a) Image originale. (b) Filtre de fréquences. (c) Soustraction de l'arrière-plan d'image. (d) Soustraction de l'arrière-plan d'image, suivi d'un filtre de fréquences. Échelle : 20 μm .

Tableau I. Statistiques des trajectoires de 12 expériences individuelles

Réplique	# Pas	# Trajectoires	Longueur (μm)	Vitesse de pas ($\mu\text{m}/\text{min}$)
Haptotaxie – Pente abrupte (8 %)				
1	207 079	2895	93 (± 89)	10.4 ($\pm 6,9$)
2	67 867	934	84 (± 71)	10.8 ($\pm 7,8$)
3	259 915	5448	99 (± 65)	14.1 ($\pm 8,7$)
4	95 461	1187	107 (± 123)	10.9 ($\pm 7,0$)
Haptotaxie – Pente douce (4 %)				
1	169 712	2318	99 (± 95)	10.5 ($\pm 7,0$)
2	21 263	182	98 (± 97)	9.2 ($\pm 6,8$)
3	138 657	739	165 (± 171)	9.9 ($\pm 6,7$)
4	141 773	2105	91 (± 89)	10.5 ($\pm 6,7$)
Chimiotaxie – Gradient soluble				
1 (fNLFNTK)	440 762	5823	115 (± 100)	16.6 ($\pm 9,6$)
1 (véhicule)	48 336	210	190 (± 209)	10.9 ($\pm 7,5$)
2 (fNLFNTK)	165 878	3282	80 (± 59)	15.0 ($\pm 8,8$)
2 (véhicule)	26 211	467	78 (± 68)	14.3 ($\pm 8,4$)

Les valeurs de longueur et de vitesse sont des moyennes et des écarts-types.

Indices de chimiotaxie

Les neutrophiles migrant sous l'agarose se comportent différemment en réponse à des gradients de concentration peptidiques formylés solubles ou liés au substrat. Dans les deux cas, les trajectoires des neutrophiles débutent de manière allongée, les cellules migrant en s'éloignant de leur position originale (puits de dépôt des neutrophiles). Toutefois, une fraction significative des cellules migrant sur les peptides liés au substrat fini par ralentir et s'accumule dans les régions de haute concentration peptidique. Ces neutrophiles exhibent encore la morphologie amiboïde, mais se déplacent de manière aléatoire autour d'une position centrale (Figure 19a et b et Film 4). Pour décrire le comportement des trajectoires, nous avons opté pour une analyse de leurs tenseurs de giration. L'explication détaillée des tenseurs se trouve dans la section

méthodologie. Toutefois, intuitivement, on peut comparer les tenseurs de giration à une représentation géométrique de la distribution et de la forme des coordonnées définissant une trajectoire. Ainsi, le rayon de giration (R_g) décrit l'étendue des positions d'une cellule dans l'espace, alors que le paramètre A2 indique le degré de linéarité d'une trajectoire. En étudiant l'évolution temporelle du carré du rayon de giration ($R_g^2(t)$) pour chaque trajectoire, en commençant par la fin de la trajectoire, nous avons détecté le comportement décrit précédemment (trajectoire allongée suivi d'une migration aléatoire) chez les cellules migrant sur les gradients peptidiques liés au substrat (Figure 19c). En effet, alors que les cellules envahissent continûment l'espace dans les expériences classiques de migration sous agarose avec gradient soluble, cet étalement plafonne pour les gradients de peptides liés au substrat. Comme la Figure 18c représente les trajectoires de leur position finale à leur position originale, le plateau (en vert) observé chez les cellules migrant sur les peptides liés au substrat est en fait une pente très douce durant la dernière moitié de la trajectoire. À l'opposé, l'évolution de la pente des cellules en contact avec un gradient soluble est plus linéaire et abrupte (en rouge). Dans l'essai d'haptotaxie, 31 % des neutrophiles bougeaient finalement de manière aléatoire autour d'un point pendant les deux heures de migration alors que seulement 10 % des cellules migrant vers un gradient soluble exhibaient cette caractéristique (Figure 20a). En tronquant la section finale des trajectoires possédant un phénotype de marche aléatoire, nous avons détecté une corrélation positive entre la concentration de peptides et le centroïde de la section de la trajectoire qui est aléatoire ci-dessus ci-dessous (Figure 20b). Combinant les résultats de 8 expériences, nous avons calculé un coefficient de corrélation de Pearson de 0.77 ($p = 1.44 \times 10^{-7}$).

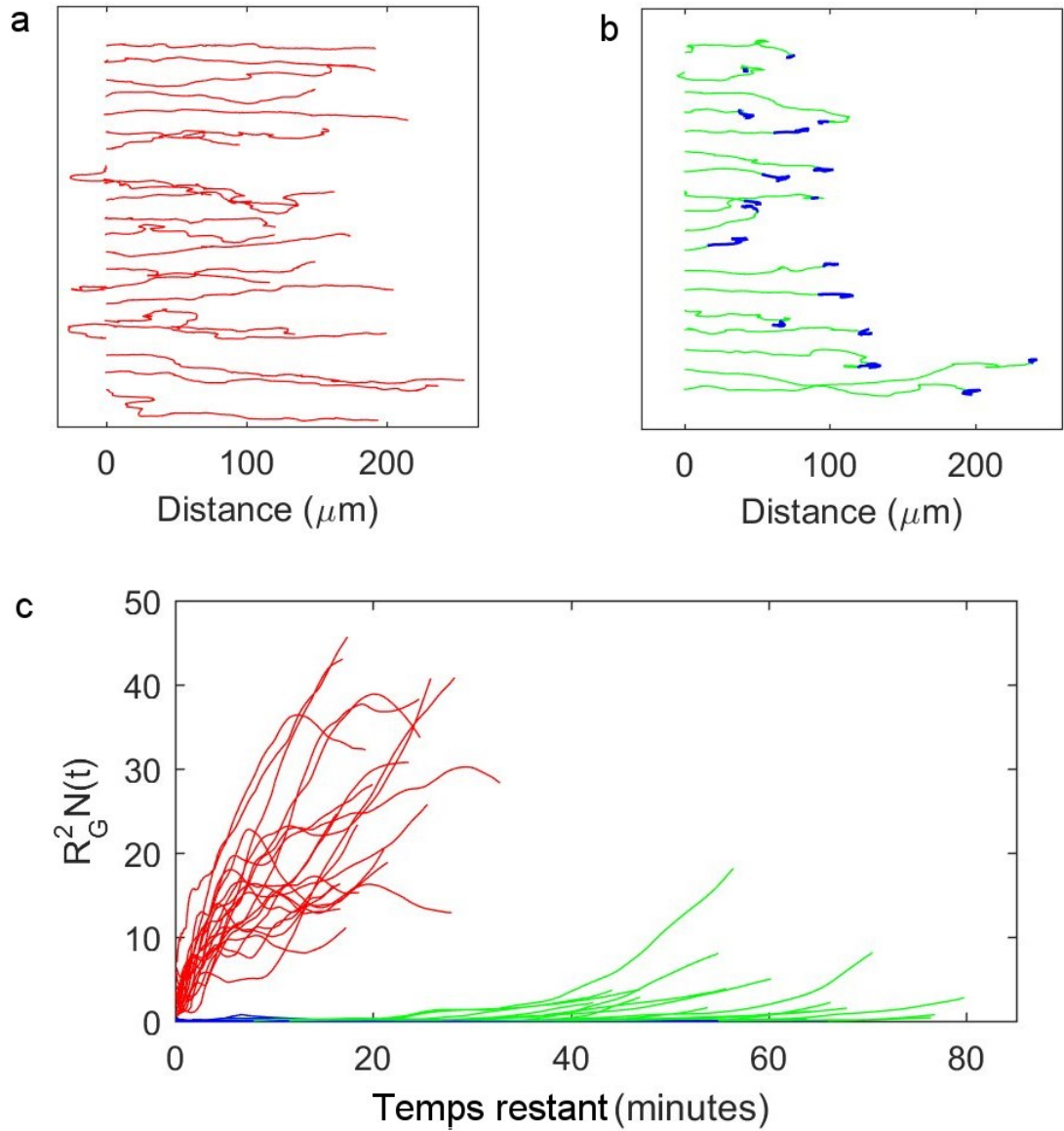


Figure 19. **Comparaison des types de trajectoires**

Trajectoires représentatives d'un essai classique d'une chambre de migration sous agarose avec gradient soluble **(a)** ou d'un essai d'haptotaxie avec gradient lié au substrat **(b)**. **(a)** Trajectoires allongées et persistantes dans le temps (rouge) **(b)** Trajectoires allongées et persistantes dans le temps (en vert), suivi d'une décélération et d'une marche aléatoire autour d'une position finale (en bleu). **(c)**. Évolution temporelle et cumulative du carré du rayon de giration. Le temps 0 correspond à la fin de la trajectoire. En rouge, trajectoires provenant d'un gradient soluble. En vert et en bleu, trajectoires provenant d'un gradient lié au substrat.

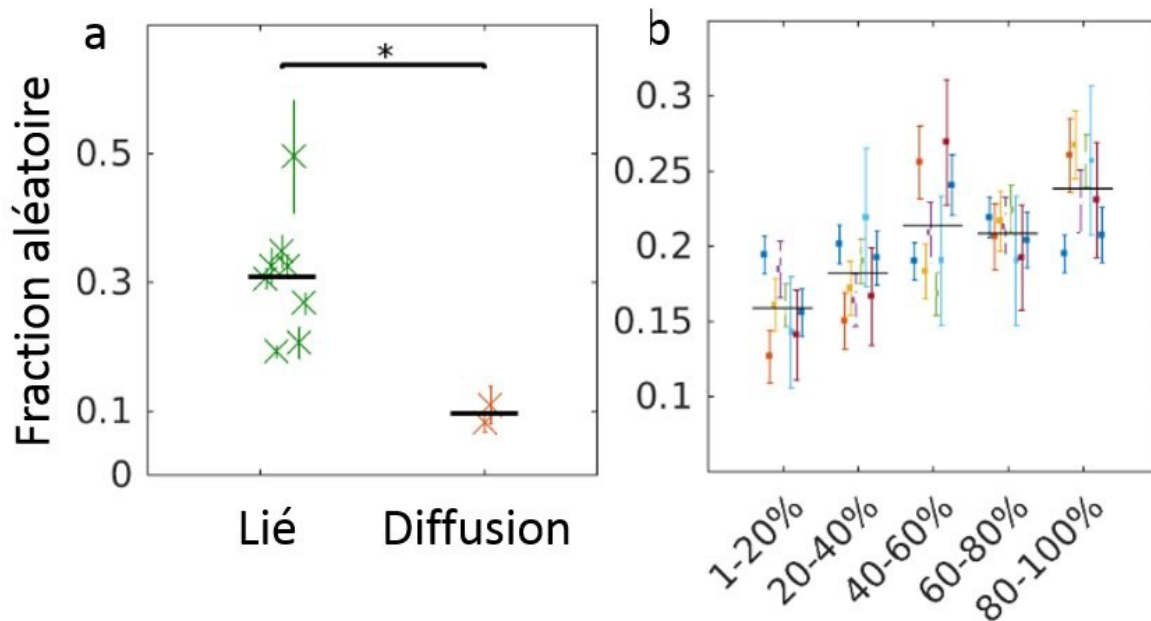


Figure 20. **Comportement aléatoire en fin de trajectoire**

(a) Fraction des cellules exhibant un comportement aléatoire en fin de trajectoire ($n = 3$ pour la chimiotaxie et $n = 8$ pour l'haptotaxie). * $p = 0.0065$ (test de Student non-pairé). (b) Fraction des cellules exhibant un comportement aléatoire en fin de trajectoire en fonction d'intervalles croissants de concentration ($n = 8$). Les différentes couleurs représentent les différentes expériences. Les barres verticales représentent la propagation de l'incertitude, basée sur la racine carré du nombre d'événements dans chacune des 8 expériences.

Rink et al. (2015) suggéraient récemment de caractériser la chimiotaxie en calculant l'indice de précision chimiotactique (« Chemotactic Precision Index » – CPI) au lieu de l'indice le plus fréquemment utilisé dans la littérature, soit l'indice de migration frontale (« Forward Migration Index » – FMI) aussi connu sous le nom d'indice chimiotactique ou indice de McCutcheon (Foxman, et al. 1999; McCutcheon 1946; Zigmond 1974). Ce groupe clame que le CPI est un meilleur indicateur de la chimiotaxie puisqu'il rapporte simultanément plusieurs aspect du mouvement cellulaire : il augmente si la cellule se déplace directement vers une cible finale (la précision dans la direction - D), il augmente si le mouvement est dans la même direction que le gradient ($\cos^2\phi$, où ϕ est l'angle entre le FMI et D), et il diminue si le déplacement diverge dans d'autres directions ($1 - |\text{SMI}|$, où SMI signifie indice de migration latérale (« Side Migration Index »). Nous avons testé la robustesse du FMI et du CPI sur notre jeu de données, tant pour les gradients liés au substrat que solubles. Pour ce dernier type d'essai, les deux indices ont augmenté lorsque les neutrophiles migraient vers des peptides formylés comparativement aux

peptides non-formylés (Figure 21). Quand les cellules migraient sur une surface de peptides liés au substrat, nous nous attendions à ce que le mouvement intrinsèque des cellules sortant de manière radiale du puit contrebalance la migration dans la direction des gradients (qui étaient placés perpendiculairement à l'axe du puit de dépôt des cellules). Le FMI, qui ne considère que le mouvement vers l'avant, tendait à être élevé et le CPI était bas, puisque les forces latérales et frontales se contrebalançaient.

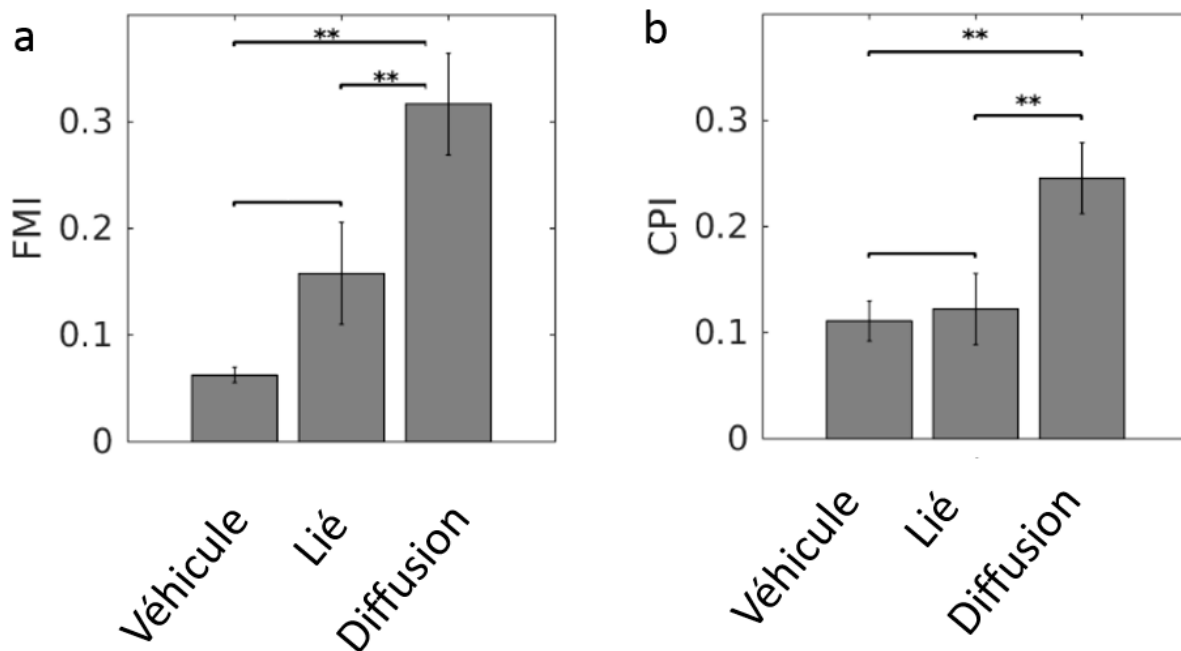


Figure 21. **Comparaison des indices de migration**

(a) Indice de migration frontale. (b) Indice de précision chimiotactique. Les indices ont été calculés pour la migration vers un gradient soluble de molécules non-chimiotactique (Véhicule), un gradient soluble de fNLFNTK (Diffusion) ou un gradient de fNLFNTK (Bound) lié au substrat. **p < 0,001 n = 21248 trajectoires provenant de 2 à 8 souris différentes par condition. La différence entre les conditions a été testée par une analyse de modèle généralisée mixte.

Dynamique de la vitesse et de l'orientation

Afin d'investiguer si la corrélation entre la quantité de cellules accumulées aux motifs peptidiques et la concentration des gradients était due à un changement de vitesses (orthokinésie) ou d'angles (klinokinésie), nous avons comparé les distributions des vitesses et des orientations de tous les pas des trajectoires (Figure 22). Indépendamment de leur orientation relative aux gradients, les neutrophiles se déplacent plus rapidement dans les régions de haute concentration peptidique. Dans le cas de l'essai classique de migration vers un gradient soluble, la vitesse est environ 20 % plus élevée dans la région à haute teneur en fNLFNTK/FITC que dans les régions de plus basse concentration ($n = 3$) (Figure 22a). Même si la corrélation est plus subtile dans le cas de l'essai d'haptotaxie, les neutrophiles se déplacent aussi significativement plus rapidement dans les régions où les peptides sont plus concentrés (moyenne de 5.7 %, $n = 8$) (Figure 22b). Cette corrélation dépend de la pente, puisque les différences sont plus prononcées pour des pentes abruptes que pour des pentes douces (Figure 23). De la même manière, dans l'essai classique avec gradient en diffusion, nous avons détecté une corrélation importante entre la vitesse de la cellule et son orientation par rapport au gradient (Figure 22c). Afin de simplifier l'analyse, nous avons considéré le gradient soluble comme étant linéaire et avons défini un pas de trajectoire comme orienté lorsque celui-ci est à l'intérieur de 45° de la direction du gradient. Un pas est opposé au gradient lorsqu'il est à l'intérieur de 45° de la direction opposée au gradient. Dans l'essai d'haptotaxie, nous n'avons pas détecté de corrélation entre la vitesse des pas de trajectoire et leur orientation (orthotaxie) (Figure 22d).

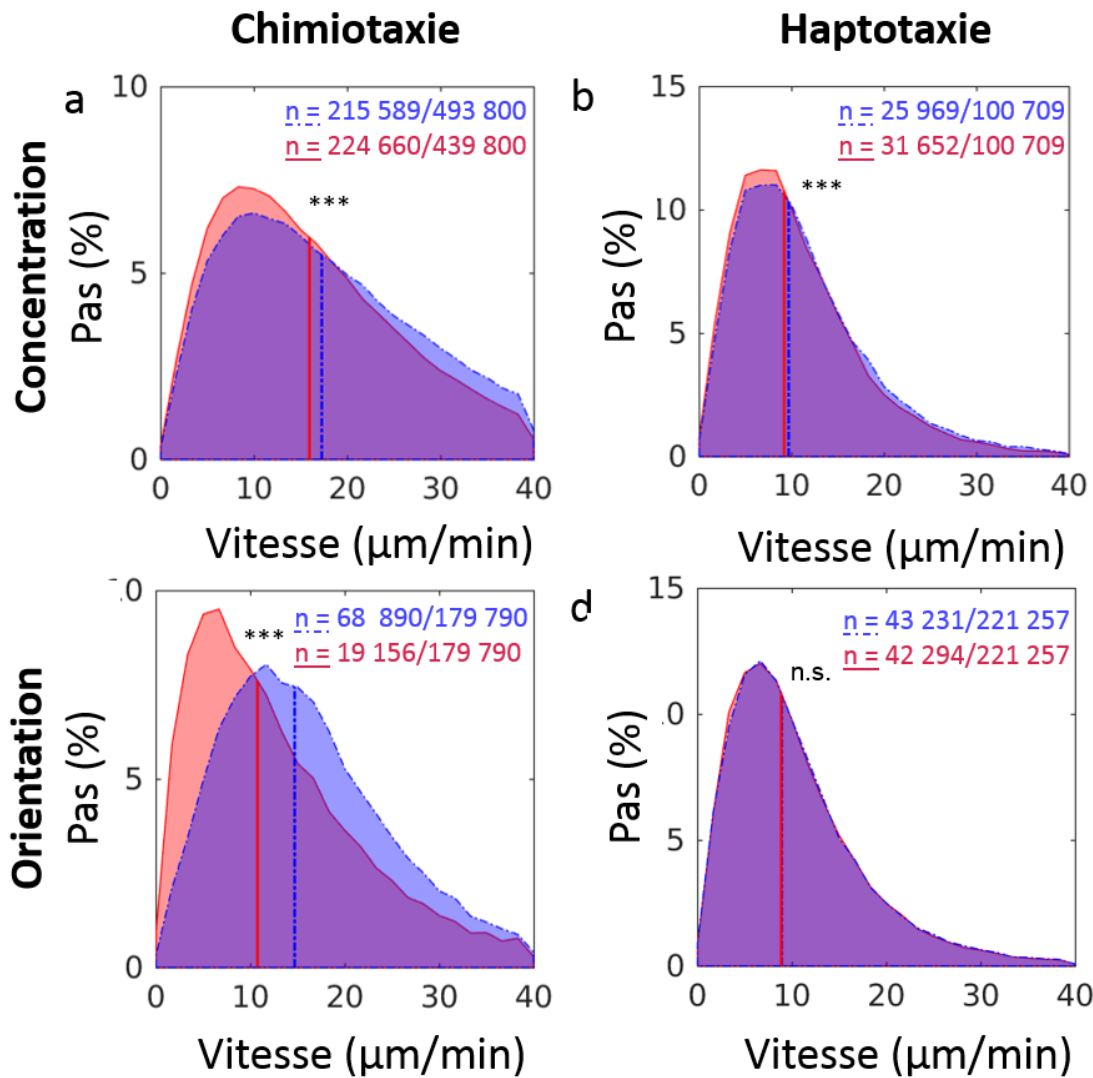


Figure 22. **Distribution des vitesses de trajectoires**

Migration de neutrophiles dans un gradient en diffusion (**a et c**) et sur un gradient lié au substrat (**b et d**). (**a et b**) Distribution des vitesses des neutrophiles migrant dans une section du gradient de basse (rouge) ou de haute (bleu) concentration. (**c et d**) Distribution des vitesses des pas de trajectoires orientés vers le gradient (bleu) ou opposés au gradient (rouge). *** $p < 0.001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). n.s., non significatif. n = nombre de pas dans une catégorie sur le nombre total de pas.

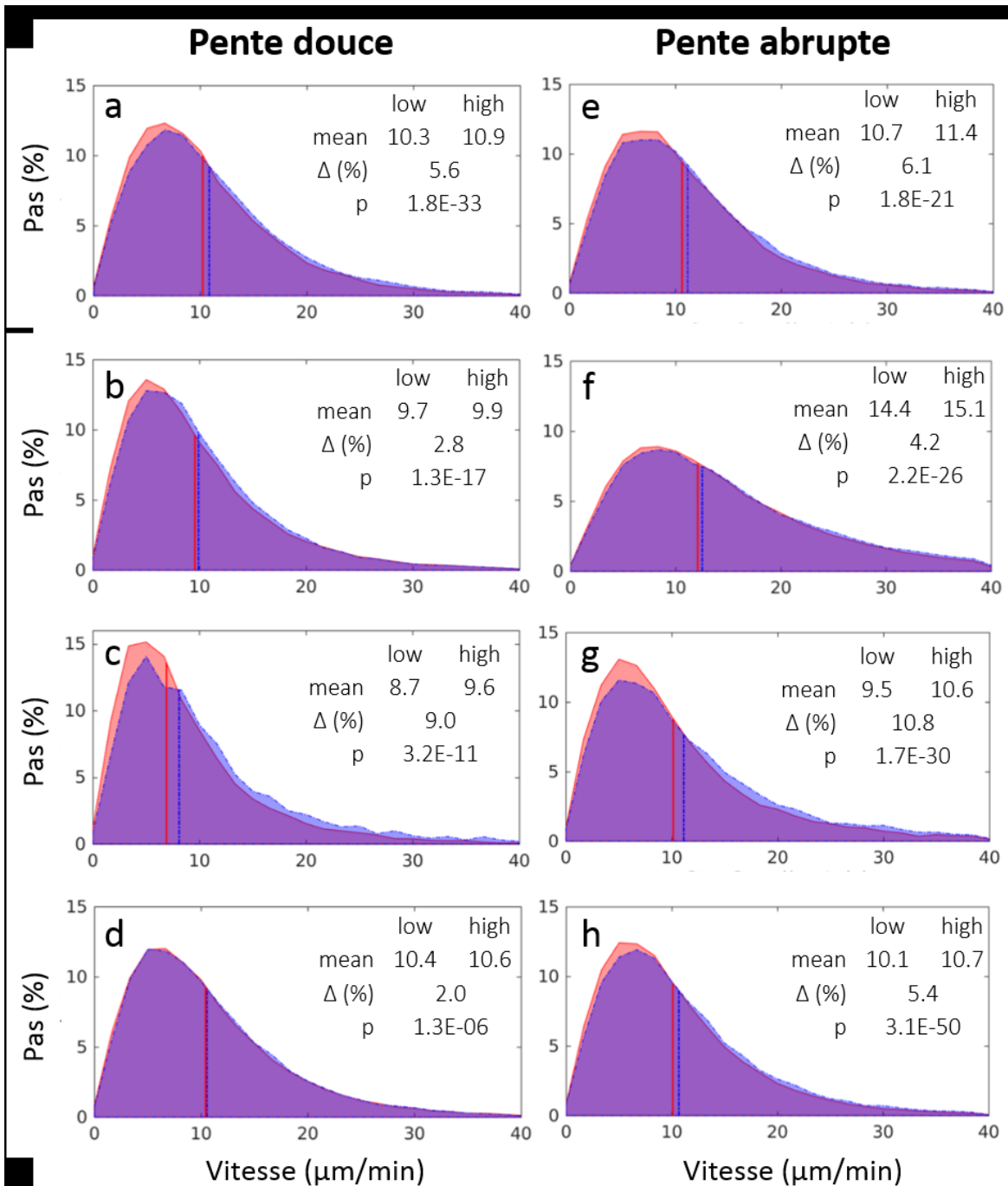


Figure 23. **Impact de la concentration sur la vitesse - en fonction de la pente**

(a-d) Pente douce. (e-h) Pente abrupte. Distribution des pas des trajectoires sur la zone (30 %) la plus concentrée en peptides (en bleu) comparativement à la zone (30 %) la moins concentrée (en rouge). La différence des moyennes des vitesses (Δ %). Le jeu de données correspond à 8 expériences indépendantes. Les valeurs de p ont été calculées avec le test de U de Mann-Whitney.

En l'absence de molécules chimiotactiques, lors de l'analyse de l'orientation des cellules dans le temps, nous observons que les neutrophiles s'orientent préférentiellement dans l'axe du puits de dépôt des cellules. Cette observation s'avère exacte surtout au début de l'essai puisqu'avec les temps, les neutrophiles tendent à s'étendre aléatoirement (Figure 24a et b). Nous avons aussi mesuré la persistance dans le temps de l'orientation spatiale des cellules en analysant les angles des paires de pas de trajectoires séparées par différents intervalles. La Figure 24c, d, e et f montre la distribution des angles selon la classification du délai, respectivement de 10 secondes, 1 minute et 10 minutes. Une cellule est définie comme allant vers l'avant lorsque le pas de la trajectoire est compris entre $[-45^\circ, 45^\circ]$ de la direction orthogonale du bord du puits, pointant en direction opposée à celui-ci. Si une cellule pointe originalement vers l'avant, il est fort probable qu'elle pointerait dans la même direction plus tard dans le temps, comme l'indique le biais dans la distribution de la Figure 24c, d et e. Au contraire, si la cellule pointe vers l'arrière $[135^\circ, 225^\circ]$ à un temps donné, elle a autant de chance de pointer vers l'avant que vers l'arrière à un temps ultérieur (Figure 24). Nous avons effectué les mêmes analyses d'orientation cellulaire dans un gradient soluble (Figure 25) ou lié au substrat (Figure 26), avec des résultats semblables.

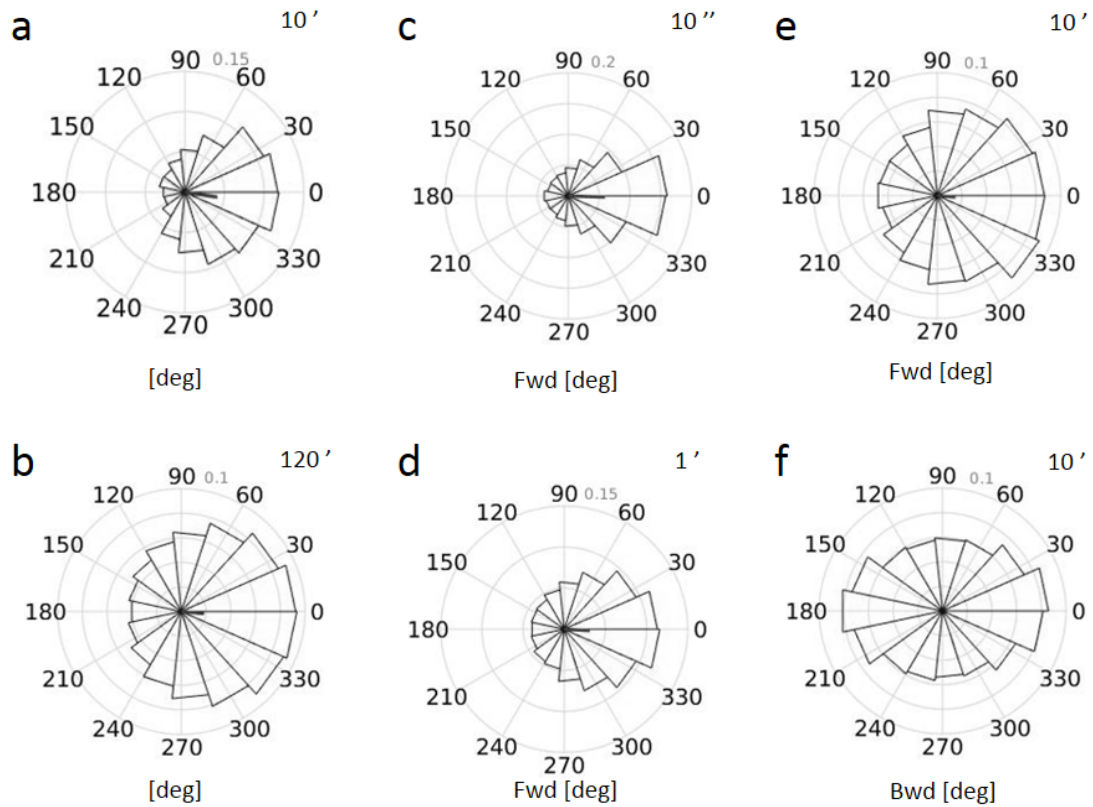


Figure 24. **Dynamique de l'orientation des cellules en l'absence de gradient**

(a et b) Distribution des angles des pas sur une période de 10 minutes (a) ou 120 minutes (b). La distribution est biaisée vers le 0° (direction opposée au puit), surtout pour les pas en début de migration. (c, d, e et f) Distribution des différences d'angles des pas suivant un pas initialement orienté vers l'avant (c, d et e), ou initialement vers l'arrière (f) pour des délais de 10 secondes (c et f), 1 minute (d) ou 10 minutes (e). Les résultats proviennent d'une expérience représentative d'une série de 8 expériences.

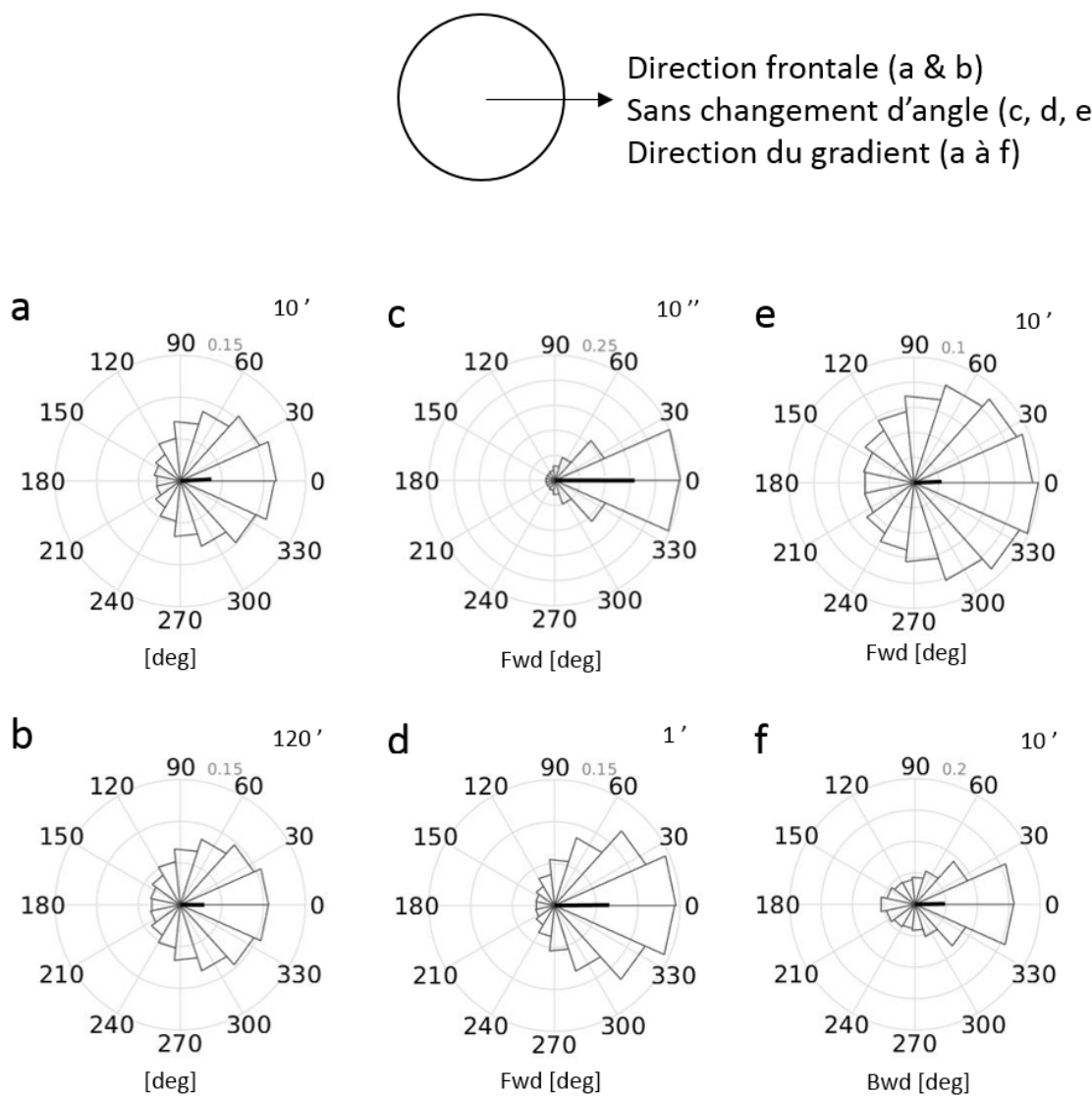


Figure 25. **Dynamique de l'orientation des cellules - peptides formylés solubles**

(a et b) Distribution des angles des pas sur une période de 10 minutes (a) ou 120 minutes (b). (c, d, e et f) Distribution des différences d'angles des pas suivant un pas initialement orienté vers l'avant (c, d et e), ou initialement vers l'arrière (f) pour des délais de 10 secondes (c et f), 1 minute (d) ou 10 minutes (e). La figure représente une expérience d'un total de deux répliques. Toutefois, la persistance observée en f n'est pas reproduite dans la seconde expérience.

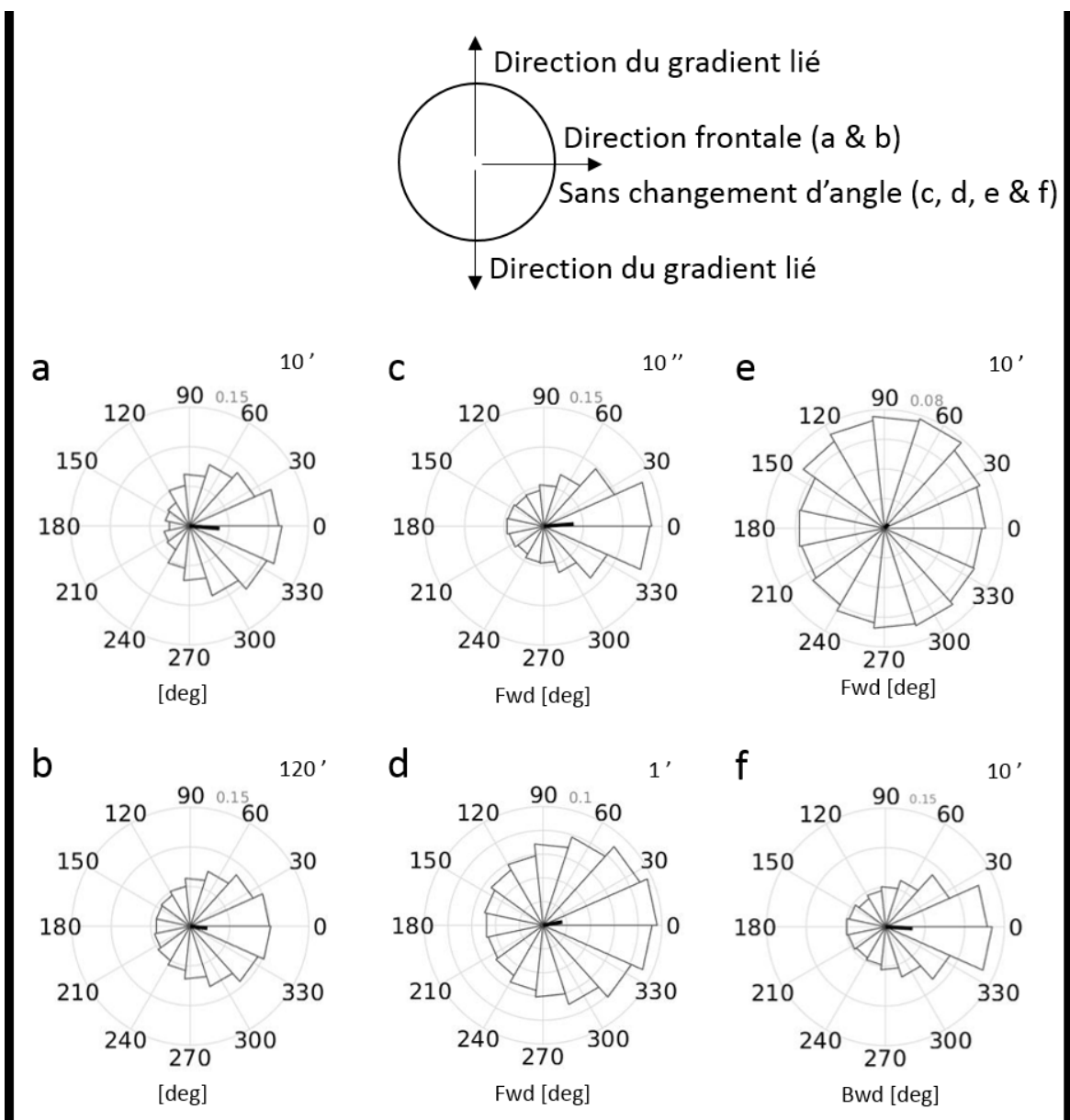


Figure 26. Dynamique de l'orientation des cellules - peptides formylés liés au substrat

(a et b) Distribution des angles des pas sur 10 minutes (a) ou 120 minutes (b). (c, d, e et f) Distribution des différences d'angles des pas suivant un pas initialement orienté vers l'avant (c, d et e), ou initialement vers l'arrière (f) pour des délais de 10 secondes (c et f), 1 minute (d) ou 10 minutes (e). La figure représente une expérience d'un total de huit répliques.

Paramètre de pénétration

Afin de caractériser plus en détail la corrélation entre la localisation des neutrophiles et la concentration du gradient peptidique lié au substrat, nous avons calculé, dans le temps, la fréquence à laquelle les cellules quittent le puits pour pénétrer l'espace sous l'agarose. En comparant le nombre de trajectoires initiées en deux heures sur deux motifs homogènes de haute (à saturation) ou de basse concentration (20% de saturation), nous avons calculé que les neutrophiles quittent le puits à une fréquence plus élevée ($p = 6.2 \times 10^{-16}$, χ^2 test) lorsqu'ils se déplacent sur un gradient de haute concentration. (Figure 27 et Film 5)

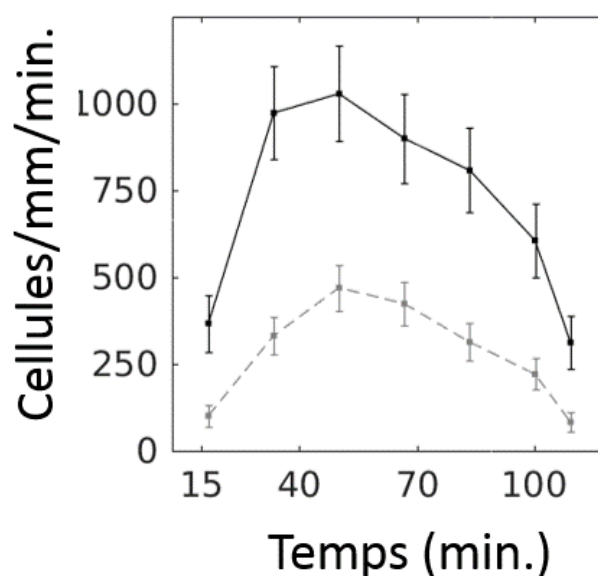


Figure 27. **Paramètre de pénétration des neutrophiles**

Le nombre de cellules quittant le puits a été déterminé à différents moments et ce nombre a été normalisé par la largeur du puits et l'intervalle de temps. Les courbes noire ou grise (pointillée) représentent respectivement les cellules sur un patron saturé ($n = 272$) et sur un patron à 20 % de saturation ($n = 211$). Les valeurs représentent les moyennes et les écarts-types de 3 expériences indépendantes.

Fonctionnalisation de CXCL8

(Données additionnelles non-publiées) Considérant qu'il est connu que le CXCL8 se lie aux protéoglycanes, nous avons cherché à fonctionnaliser cette molécule à la surface de la chambre de migration. À cette fin, nous avons opté pour un LAPAP classique, liant la biotine (B4F) à la surface d'un pètri auquel nous avons ensuite ajouté en sandwich de la streptavidine et du CXCL8 préalablement biotinylé. Nous avons ensuite effectué un essai d'haptotaxie sur ce gradient, sans observer de migration préférentielle en direction du gradient (Figure 28a). Au contraire, comparativement aux contrôles, il y a très peu de cellules présentes sur les motifs de CXCL8. Afin de nous assurer du succès de l'immobilisation du CXCL8, nous avons mesuré par absorbance la présence du CXCL8. Pour ce faire, nous avons effectué un ELISA dans lequel nous avons incubé le motif de CXCL8 et des motifs contrôles avec un anticorps contre le CXCL8 suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire lié au HRP. Ainsi, malgré l'absence d'haptotaxie, nous avons confirmé la liaison du CXCL8 au substrat (Figure 28b). Pour nous assurer que la biotinylation du CXCL8 n'influence pas la liaison de celui-ci au récepteur cellulaire, nous avons testé le pouvoir chimiotactique du CXCL8 biotinylé en diffusion dans une chambre de migration sous agarose classique (Tableau II). Comme nous n'avons pas détecté de différence de chimiotaxie entre la molécule native ou biotinylée, nous concluons que l'absence de potentiel chimiotactique du CXCL8 lié au substrat n'est pas directement due à la présence de biotine. Nous pensons que nous pourrions améliorer la présentation de la molécule en la liant aux glycosaminoglycanes plutôt qu'au verre passivé avec de l'albumine. Autrement, nous pourrions modifier le CXCL8 avec la fluorescéine au lieu de la biotine, diminuant ainsi l'encombrement stérique causé par la taille imposante de la streptavidine. Finalement, pareillement à un groupe ayant lié le CCL21 au verre par LAPAP, (Schwarz and Sixt 2016; Schwarz, et al. 2017) nous envisageons de placer un espaceur moléculaire entre la biotine et le CXCL8, modifiant l'encombrement stérique de ce dernier.

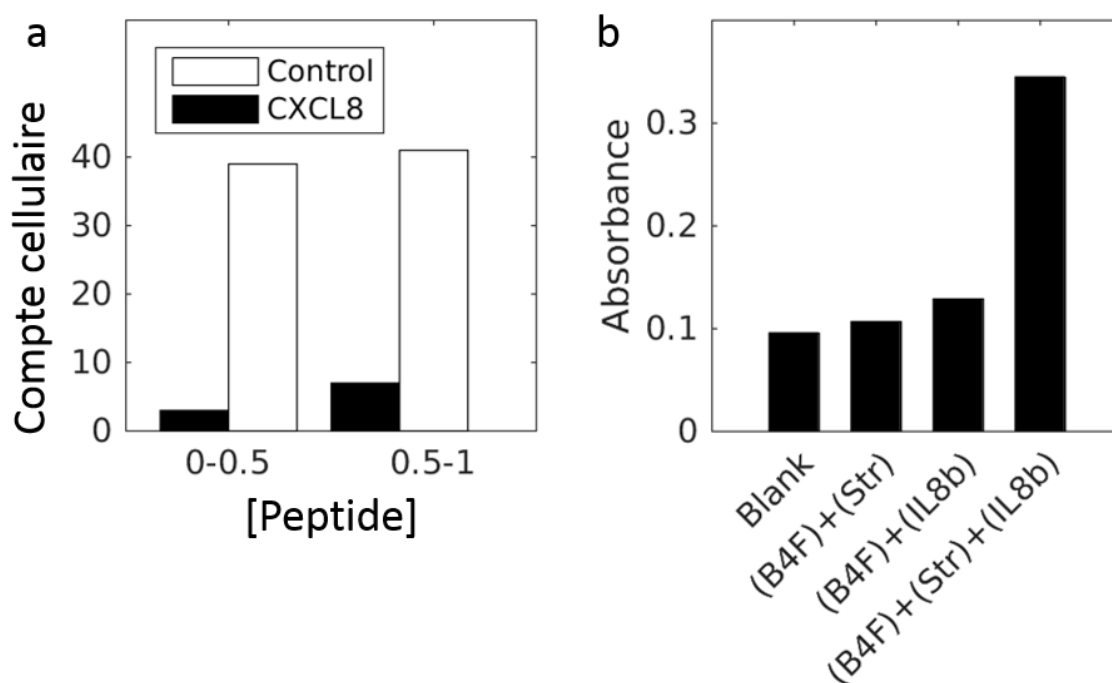


Figure 28. **Fonctionnalisation de CXCL8**

(a) Compte absolu de cellules sortant du puits sur des gradients de CXCL8 ou de biotine (Contrôle) pour des régions de basse et de haute concentration. (b) ELISA détectant par absorbance la présence de CXCL8 sur des motifs de biotine incubée avec de la streptavidine (B4F + Str), de biotine incubée avec le CXCL8 biotinylé (B4F + IL8b) ou de biotine incubée avec de la streptavidine et le CXCL8 biotinylé (B4F + Str + IL8b).

Tableau II. Front de migration de CXCL8

	Distance (µm)	
	Vers l'agoniste	Vers le véhicule
fNLFNTK (200nM)	1158	138
CXCL8-natif (1nM)	449	208
CXCL8-biotine (1nM)	516	159

Discussion

Nous avons utilisé une technique optique de création de motifs pour générer des gradients de peptides formylés liés au substrat avec une précision de 1 μm , telle que déterminée par la limite de diffraction (Belisle, et al. 2008a). L'alignement des gradients et l'approche d'imagerie permettent l'analyse d'une grande quantité de neutrophiles, sous diverses conditions. À l'opposé des chambres de Boyden, Zigmond et Dunn, la création de motifs protéiques donne des gradients bien définis dont on peut facilement reproduire la forme. La stabilité du gradient est assurée par les liens covalents avec la surface. Ces liens préviennent la formation d'un gradient soluble à proximité de la surface, comme lors de l'utilisation de tampon d'hydrogel (Rink, et al. 2015). Même si, *in vivo*, les neutrophiles sont probablement exposés tant à des gradients solubles qu'immobilisés, ces fluctuations temporelles compliquent l'interprétation des essais de migration *in vitro*.

Nos résultats démontrent que, en plus des peptides formylés solubles ou imprimés, les neutrophiles répondent aux signaux liés de manière covalente. La moyenne des vitesses détectée dans les zones de haute concentration est plus grande que celle détectée dans les zones de basse concentration en peptides immobilisés. Ces hautes vitesses sont observées jusqu'à ce que les cellules changent de mode de locomotion, de l'haptotaxie à l'haptokinésie. Lors de l'haptokinésie, les trajectoires sont aléatoires, de basses vitesses et centrées autour d'un point. Un comportement mixte (haptotaxie suivi de haptokinésis) reproduit la situation *in vivo*, où les neutrophiles s'arrêtent lorsqu'ils atteignent leur destination finale (de Oliveira, et al. 2013; Kreisel, et al. 2010; Lammermann, et al. 2013). Nous proposons le carré du rayon de giration comme paramètre décrivant l'accumulation des neutrophiles à leur cible. Ce paramètre est particulièrement intéressant pour établir l'évolution de la forme d'une trajectoire dans les temps.

Les modifications apportées à l'essai classique de chambre de migration sous agarose permettent de tester les gradients de protéines de forme aléatoire simplement. Les pentes testées ont été choisies à partir d'études précédentes qui montraient que les neutrophiles étaient sensibles à des différences de concentration de 1 à 10 % (Song, et al. 2006; Zigmond 1977). Les neutrophiles exhibent une réponse plus robuste aux gradients abrupts qu'aux pentes douces. Ces observations concordent avec les études précédentes, qui rapportaient une corrélation positive

entre la réponse au CXCL8 et la pente du gradient (Moghe, et al. 1995). On rapporte aussi, lors d'une expérience de microfluidique, que des neutrophiles migrant dans des canaux préfèrent les pentes abruptes aux pentes douces (Ambravaneswaran, et al. 2010).

La chimiotaxie des neutrophiles est gouvernée par une multitude de signaux générés par les agents infectieux et les cellules immunitaires résidentes, incluant les neutrophiles eux-mêmes. Dans notre essai, nous avons trouvé que les neutrophiles tendent à s'éloigner du puits, ce qui résulte en un biais dans la direction frontale, même en l'absence de molécules chimiotactiques ou lorsque le gradient est perpendiculaire à la direction frontale. Ceci suggère que les neutrophiles sécrètent des chimiokines dans le puits de dépôt des cellules, confondant l'influence des gradients immobilisés. Alors qu'une telle action chimiorépulsive est depuis longtemps reconnue, celle-ci est considérée comme ayant peu d'impact sur la densité cellulaire à laquelle les essais sous agaroses sont réalisés (Lauffenburger, et al. 1983; Nelson, et al. 1975). Toutefois, nos résultats (Figure 7, Film 4 et 5) indiquent qu'à cette densité, les chimiokines sécrétées par les neutrophiles, tel le CXCL8, sont peut-être présentes en assez grande quantité pour provoquer la chimiorépulsion via un mécanisme de signalisation paracrine (Siddiqui, et al. 1999). En effet, CXCL8 à basse concentration est chimiotactique pour les neutrophiles, mais il devient répulsif à des concentrations de 1 μ M (Tharp, et al. 2006). Le mouvement biaisé que nous observons semble différent de la migration inverse, qui a été attribuée à une désensibilisation aux molécules chimiotactiques (Holmes, et al. 2012). La force de la chimiorépulsion peut aussi expliquer pourquoi nous n'observons pas de préférence claire dans l'orientation du mouvement cellulaire vers le gradient immobilisé. Rappelons que les gradients immobilisés sont orientés perpendiculairement au rayon du puits. Ces observations sont les mêmes, peu importe le temps de sortie du puits, ou la distance au puits (données non incluses). Une faible orientation préférentielle peut être extrapolée des données de la Figure 26e, où les trajectoires cellulaires sont tirées vers les côtés par rapport à leur orientation initiale. Toutefois, dans tous les autres cas, les trajectoires sont orientées vers l'avant de manière persistante dans le temps. La chimiorépulsion est aussi conforme avec l'absence de différence de CPI entre les gradients liés à un substrat et les gradients de solution véhicule.

Les mécanismes inhérents aux réponses distinctes observées entre les peptides solubles et liés à un substrat restent à être examinés. Toutefois, nous pouvons spéculer que les peptides liés

induisent des différences dans la distribution topographique, l'association/dissociation, la dimérisation ou la fréquence d'internalisation des récepteurs (Hoffman, et al. 1996; Lomakina, et al. 2014). Hoffman *et al.* (1996) calculent l'expression des récepteurs à jusqu'à 71 000 récepteurs/cellules, selon la régulation du récepteur. Ce nombre est du même ordre de grandeur que notre valeur calculée de 2.4×10^4 molécules liées/cellules (pour une cellule type de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$). À titre de comparaison, lorsqu'exposée à 50 nM de fMLF en solution, pour un volume de $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$, une cellule perçoit 3.0×10^4 molécules en diffusion. Schwarz *et al.* (2016) rapportent un gradient de CCL21 produit par LAPAP et ont aussi calculé une densité de surface comparable à la nôtre, soit 160 molécules/ μm^2 .

Nous proposons le paramètre de pénétration comme indice décrivant la dynamique de sortie des cellules du puits, donc entrant dans l'espace sous l'agarose. Nous expliquons la corrélation entre la densité des neutrophiles et la concentration du gradient décrit à la Figure 17 par la modulation du paramètre de pénétration combinée à l'accumulation de cellules à la cible, tels que décrits par les tenseurs de giration.

Nous avons développé un essai de migration sous agarose de contenu massif pour l'étude de l'haptotaxie *in vitro*. Cet essai permet un contrôle micrométrique de la géométrie des gradients chimiquement liés à un substrat. Il offre aussi l'avantage d'étudier des phénomènes biologiques normalement associés à la 3D, en confinant les neutrophiles un espace bidimensionnel. Nous pourrions donc étudier les mouvements interstitiels indépendants des intégrines (Ambravaneswaran, et al. 2010; Bergert, et al. 2015; Lammermann, et al. 2008; Schwarz and Sixt 2016). Un tel essai de confinement est particulièrement intéressant pour l'étude de cellules peu adhérentes, comme les neutrophiles ou les cellules dendritiques (Schwarz and Sixt 2016). Dans cette étude, nous avons fabriqué des gradients de peptides formylés liés à une surface de verre passivée d'albumine. En plus des petits peptides, le LAPAP permet d'adsorber différents types de molécules, tels des chimiokines, des biotines ou des anticorps, à une variété de substrats, tels le plastique, le PEG, le PDMS ou même les membranes cellulaires (Belisle, et al. 2014; Binan, et al. 2016a; Schwarz, et al. 2016; Schwarz and Sixt 2016). Toutefois, pour immobiliser avec succès les molécules, il est nécessaire de porter une attention particulière au design de la molécule, considérant l'adhésion inhérente de la molécule au substrat et la présentation du domaine de liaison à la cellule (Schwarz, et al. 2016; Schwarz and Sixt 2016).

De plus, avec le LAPAP nous pouvons réaliser des gradients continus, l'appliquant aux études portant spécifiquement sur l'étalement ou l'adhésion cellulaire en fonction de la densité de substrat. Le LAPAP représente une alternative à l'impression par microcontact et est compatible avec les plateformes de microfluidique (Schwarz, et al. 2016).

Les molécules chimiotactiques peuvent être anioniques ou comporter des sites hydrophobes; elles ont donc le potentiel de se lier aux surfaces (Stein, et al. 2001). La littérature décrit l'haptotaxie des neutrophiles pour le CXCL8 lié à la matrice extracellulaire (Stein, et al. 2001), le PAF lié aux filtres (Kuijpers, et al. 1992), le C5a (Rot 1992) et finalement les exosomes présentant le LTB4 (Majumdar, et al. 2016). Le fMLF peut lier l'albumine (Mellor, et al. 1986; Wilkinson and Allan 1978), les endopeptidases neutres (EC 3.4.24.11) (Connelly, et al. 1985) et contribuer à l'association des neutrophiles à la fibrine et aux caillots sanguins (Loike, et al. 1999; Loike, et al. 1995), stimulant la migration. Puisque la fibrine, l'albumine et les endopeptidases neutres sont présentes dans les tissus endommagés (Johnson, et al. 1985), il est plausible de présumer que l'immobilisation du fMLF survient *in vivo*. Les endopeptidases neutres clivent les peptides formylés et peuvent ainsi faire varier localement les niveaux de peptides présents et disponibles. À notre connaissance, *in vivo*, il n'y a pas eu de preuves directes de la présence de gradients de molécules chimiotactiques liés à la matrice s'étendant des jonctions endothéliales jusqu'aux tissus sous-jacents. Toutefois, au-delà des vaisseaux sanguins, le recrutement des neutrophiles vers les tissus doit être régulé par la présence de gradient de peptides formylés, responsable de la dernière étape de la migration vers les zones endommagées (Heit, et al. 2008; McDonald, et al. 2010). Nous croyons aussi que notre essai d'haptotaxie peut être adapté à la détection de pathologie (Sackmann, et al. 2014; Sackmann, et al. 2012).

Avec notre approche d'imagerie et d'analyse d'images, nous avons pu étudier un grand nombre de trajectoires, révélant des subtilités propres à l'haptotaxie. Nous avons montré que les neutrophiles humains ont la capacité de répondre au fMLF lié à un substrat de culture. Les neutrophiles sortent du puits préférentiellement dans des zones de haute concentration peptidique, tel que le démontre le paramètre de pénétration. Dans ces régions, les cellules commencent par accélérer, et arrêtent ensuite abruptement de migrer dans une direction pour s'accumuler autour d'une cible d'intérêt. Les cellules passent donc de l'haptotaxie à l'haptokinésie. Ceci est semblable au comportement observé *in vivo*, où les cellules arrêtent de

migrer lorsqu'elles arrivent au site d'inflammation. Nos résultats documentent aussi un effet de chimiorépulsion que nous croyons corrélé à la haute densité cellulaire dans les puits de dépôt. Finalement, l'haptotaxie étant d'actualité dans la littérature, nous croyons que notre essai est une avenue intéressante pour l'étude des mécanismes moléculaires inhérents à celle-ci.

Légendes des films

Film 1. Essai classique sous agarose. Neutrophiles mis en présence de peptides formylés en solution. Panneau de gauche : neutrophiles migrant vers la source de fMLF. Panneau de droite, neutrophiles migrant vers la solution véhicule. Échelle : 100 μm . Le film montre environ le quart du champ microscopique. Étiquette du temps : hh : mm. La fréquence vidéo est de 30 images/seconde.

Film 2 Haptotaxie. Neutrophiles migrant sur un gradient lié au substrat. Les lignes indiquent les régions de concentration maximale et minimale. Les flèches indiquent la direction du gradient. Échelle: 100 μm . Le film montre environ le quart du champ microscopique. Étiquette du temps : hh : mm. La fréquence vidéo est de 30 images/seconde.

Film 3. Morphologie des neutrophiles. Microscopie à champ clair montrant la forme amiboïde de neutrophiles migrant sous l'agarose vers une solution véhicule (panneau de gauche), une solution de fMLF soluble (panneau du centre) ou sur gradient lié au substrat (panneau de droite). Échelle : 20 μm . Étiquette du temps : hh : mm. La fréquence vidéo est de 30 images/seconde.

Film 4. Amas de neutrophiles. Les cellules s'amoncellent sur un gradient d'une largeur de 100 μm . Les lignes indiquent les limites du gradient. Le cercle indique le centre de l'amas. Étiquette du temps : hh : mm. La fréquence vidéo est de 30 images/seconde.

Film 5. Paramètre de pénétration des neutrophiles. Neutrophiles migrant sur des motifs peptidiques homogènes. Panneau du haut, cellules migrant sur un motif à 20 % saturé. Panneau du bas, cellules migrant sur un motif saturé. Échelle: 100 μm . Étiquette du temps : hh : mm. La fréquence vidéo est de 30 images/seconde.

Section 2. Chimiotaxie des neutrophiles en contexte tumoral

Avant-propos

En parallèle à la réalisation du projet précédemment décrit, nous avons développé une collaboration avec Dr Siegel et son équipe. Leurs travaux portent sur le cancer du sein, dont sur l'implication des neutrophiles dans le processus métastatique ainsi que sur la transformation des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales et vice-versa. Les deux sections suivantes présentent les résultats de cette collaboration.

Depuis quelques années, les données décrivant la plasticité des neutrophiles s'accumulent (Mantovani, et al. 2011). Une sous-population de neutrophiles qui sédimentent à une plus basse densité que normalement sur un gradient de Bøyum a été associée à un phénotype protumoral (Sagiv, et al. 2015). Les « Low-Density Neutrophils », LDNs, répondraient donc différemment aux signaux des environnements tumoraux. Il n'existe actuellement que peu d'informations concernant la chimiotaxie des LDNs par rapport à celles des « High-Density Neutrophils », les HDNs. Une publication présente une chimiotaxie réduite vers un milieu conditionné tumoral (Sagiv, et al. 2015) alors qu'une autre démontre un nombre de récepteurs à fMLF plus élevé (Herteman, et al. 2017). Notre étude compare les réponses chimiotactiques à deux milieux conditionnés tumoraux provenant d'organes distincts. Après avoir découvert une réponse spécifique à un milieu conditionné provenant de métastases de foie, nous avons établi que cette réponse dépend des récepteurs au C3a. Nous présentons des analyses statiques et dynamiques provenant des données d'essais de migration sous agarose.

Un manuscrit, dont je suis co-première auteur, est en cours de rédaction. Celui-ci inclut, en plus des résultats présentés ici, une série d'analyses de séquençage d'ARN, de cytométrie de flux, et d'ELISA ayant guidé nos analyses de migration. J'ai réalisé l'entièreté des expériences de migration ainsi que les analyses.

Méthodologie

Isolation et coloration des neutrophiles

Les neutrophiles murins ont été isolés par l'équipe du Dr Peter Siegel. En bref, le sang total a été obtenu par ponction cardiaque, avec de l'EDTA comme anticoagulant. Les cellules ont été isolées à l'aide d'un gradient de densité suivi d'une lyse hypotonique des globules rouges. Les HDNs se sont séparés sur un gradient discontinu Histopaque (Sigma) à l'interface 1.077-1.119, alors que les LDNs l'ont été à l'interface plasma-1.077. Les cellules possédant les marqueurs Ly6G et CD11b ont ensuite été triées par cytométrie de flux (FACS Aria II). La pureté de l'isolation est toujours plus grande que 90% et la viabilité moyenne est de 95%. Toutes les expériences ont été réalisées selon les politiques et les protocoles du « Comparative Medicine and Animal Resources Centre » (CMARC) de l'Université McGill. Le comité d'éthique de recherche sur les animaux a approuvé le protocole expérimental.

Pour faciliter l'observation en microscopie à fluorescence, l'ADN des neutrophiles a été coloré avec le LDS751 (Molecular Probe), 10 µg/ml, pendant 5 minutes à 37 °C (Khreiss, et al. 2004). Nous avons lavé et placé les cellules dans un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) contenant 5 % de FBS. 2.5×10^5 cellules par puits ont été déposées. Les cellules traitées avec un antagoniste du récepteur du C3a, inhibant compétitivement la liaison du C3a (SB 290157 Cayman Chemical) ont été incubées à une concentration de 1 µM pendant 30 minutes à 37 °C avant l'étape de la coloration au LDS751.

Milieu tumoral conditionné

L'équipe du Dr Siegel nous a fourni le milieu tumoral conditionné. En bref, des cellules d'une lignée murine de carcinome mammaire (4T1, ATCC) qui ont été injectées dans un modèle animal (souris BALB/c) ont ensuite été isolées de sites métastatiques secondaires (Rose, et al. 2010; Rose, et al. 2007; Tabaries, et al. 2011; Tabaries, et al. 2015). Les lignées agressives provenant du foie (2776) et du poumon (526) ont été mises en culture dans un milieu DMEM, supplémenté de 10 % de FBS et d'acides aminés non essentiels. Le jour subséquent, après deux lavages au PBS, le milieu a été remplacé par un milieu sans sérum. Après 48 heures, le milieu

des cellules a été collecté et centrifugé 5 minutes pour sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant a été conservé à une température de -80 °C jusqu'à son utilisation.

Préparation des pétris d'agarose

Des pétris de culture montés d'une lamelle de verre ont été préalablement incubés avec de l'albumine bovine (BSA) 3 % pendant 15 minutes et rincés trois fois avec du PBS. Cette passivation réduit les liaisons peptidiques non spécifiques et favorise l'adhérence des cellules au substrat. Nous avons chauffé de l'agarose à faible point de fusion (UltraPure) dans une solution saline de Earle (EBSS, Gibco) à une concentration de 4.8 % et dilué cette solution mère à une concentration finale de 1.2 % dans du milieu RPMI 1640 (10 % de FBS). L'épaisseur finale de la couche d'agarose mesurait environ 3 mm afin qu'une fois trouée avec un poinçon à biopsie de 2 mm, le volume des puits soit de 10 µl. Nous avons rempli le puits avec une solution de Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂ (WKYMVdM, Sigma-Aldrich) à 10 nM, du milieu tumoral conditionné de foie ou de poumon, du C3a à 1 µg/ml (8085-C3-025, R&D Systems) ou du C5a (2150-C5, R&D Systems) à 0.1 µg/ml. Les solutions ont diffusé dans le gel 15 minutes, générant un gradient de concentration stable, avant que ne soient déposés les neutrophiles.

Acquisition d'images

Les LDNs et les HDNs ont été photographiés avec le système d'imagerie TIRF SD Hamamatsu équipé d'une caméra ImageEMX2 EM-CCD (16 micron/pixel). Le logiciel Zen de Zeiss contrôlait l'acquisition d'image et les mouvements de la plateforme du microscope équipée d'un objectif 10X et d'un filtre de bande d'excitation de 542 à 582 nm et de bande d'émission de 603 à 683 nm. Tout au long de l'acquisition d'images, nous avons maintenu les neutrophiles à 37 °C et à 5 % de CO₂. La fréquence d'acquisition des images était de 35 secondes.

Détection et suivi des trajectoires

Nous avons développé un script MATLAB (MathWorks,) pour l'analyse d'image, la détection des cellules, le suivi et l'analyse des trajectoires générées.

La détection des neutrophiles était basée sur une estimation de l'intensité du bruit en appliquant une ouverture morphologique sur l'image originale à l'aide d'un élément structurant circulaire du double du diamètre d'un neutrophile type. Nous avons ensuite soustrait ce bruit de fond calculé à partir de l'image originale et nous avons aussi appliqué un filtre à bande passante pour accentuer les éléments de la taille de neutrophiles (Crocker and Grier 1996). Nous avons défini la position d'une cellule comme étant le pixel de plus haute intensité dans une région définie par un seuil établi par la méthode de Otsu (Otsu 1979).

Nous avons déterminé les trajectoires des cellules par une approche des plus proches voisins (« Nearest-neighbor »), où l'on minimise globalement la distance totale liant les objets des trajectoires. Nous avons modifié l'algorithme de u-track (Jaqaman, et al. 2008b) en optimisant localement le rayon de recherche maximal par un calcul de la moyenne spatio-temporel (Mazzaferri, et al. 2015).

Calcul des paramètres statiques de la chimiotaxie

Nous avons calculé le nombre de cellules sorties des puits en deux heures de migration, normalisé par l'aire des surfaces photographiées. Le pourcentage de cellules ayant migré vers la solution chimiotactique a été calculé en divisant leur nombre par le nombre total de cellules sorties des puits. Nous avons aussi calculé le ratio du nombre de cellules migrant vers une solution chimiotactique et du nombre de cellules migrant vers une solution véhicule. Finalement, nous avons déterminé le front de migration en mesurant les distances linéaires entre la périphérie du puits et les centroïdes de chaque cellule détectée. Nous avons défini le front comme le 85^e percentile de la distribution des distances au puits de l'ensemble des cellules afin de minimiser l'impact de quelques observations aberrantes.

Résultats

Les LDNs répondent aux signaux provenant du foie

Nous avons mesuré la chimiotaxie des sous-populations de neutrophiles, les LDNs et les HDNs, envers deux milieux conditionnés provenant de cellules cancéreuses de métastases du foie ou du poumon. Les cellules ont migré dans une chambre classique de migration sous agarose, selon

deux schémas expérimentaux. Dans le premier, les cellules étaient déposées dans un puits central et de chaque côté diffusaient des gradients solubles de solutions chimiotactiques (agoniste) ou contrôles (véhicule) (Figure 29). Nous avons aussi placé les solutions dans le puits central, vers lequel les LDNs et les HDNs, de chaque côté, migraient. Le nombre de cellules détectées après deux heures était calculé pour des régions de taille définie. En comparant les pourcentages de cellules migrant vers les milieux conditionnés versus les cellules migrant vers une solution véhicule, nous observons que les LDNs répondent au milieu conditionné de métastase de foie, à l'opposé des HDNs (Figure 30 et Figure 31). Aucune des sous-populations ne répond au milieu conditionné de métastase du poumon. Comme ce dernier ne semblait pas induire de réponse intéressante, nous avons poursuivi les expériences le milieu conditionné de métastase de foie. Le Tableau III présente les ratios de cellules ayant migré vers la solution agoniste ou vers le véhicule pour chaque expérience. Ce tableau met en évidence la variabilité intrinsèque au système. Les LDNs et les HDNs répondent au peptide WKYVM de manière semblable.

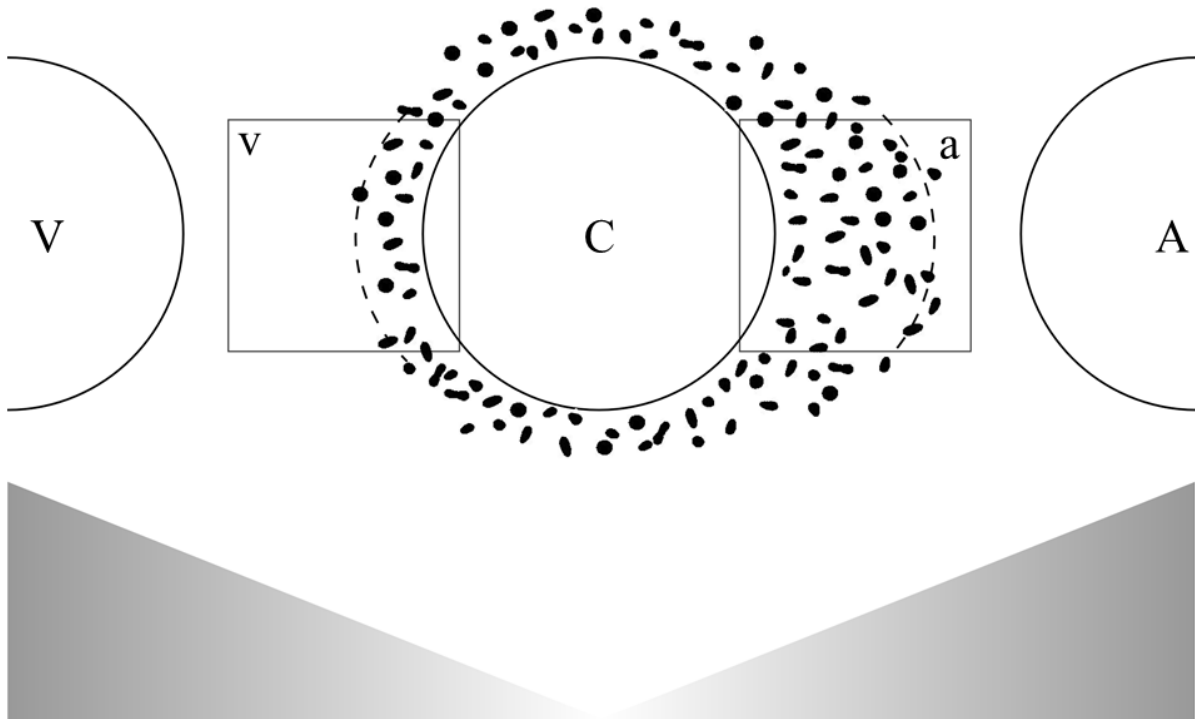


Figure 29. **Chambre de migration sous agarose avec gradient de diffusion**

Les cellules sont déposées dans le puits central (C) et la solution chimiotactique agoniste (A) est placée d'un côté alors que la solution véhicule (V) est placée de l'autre. Le calcul du pourcentage de cellules sorties des puits après 2 heures de migration est effectué en divisant le nombre de cellules dans la boîte « a » ou « v » par la somme de « a » et de « v ». Le ratio de « a » sur « v » a aussi été calculé. Le front de migration est représenté par l'arc pointillé.

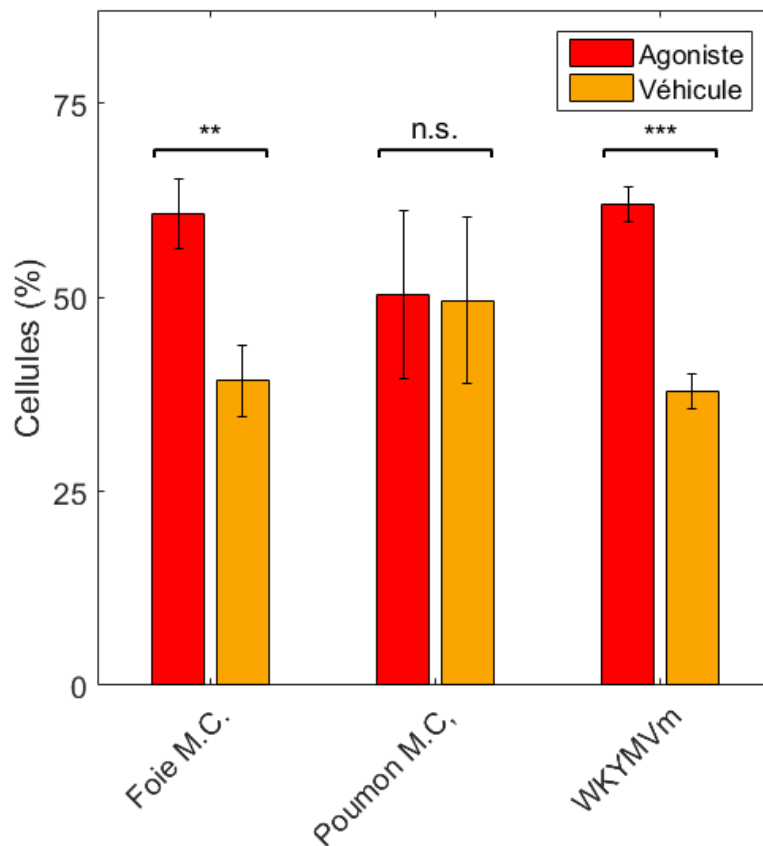


Figure 30. **Pourcentage de LDNs migrant vers les gradients**

Pourcentages des cellules ayant migré pendant 2 heures en direction d'un milieu conditionné provenant de métastases de foie (Foie M.C.), de poumon (Poumon M.C.) ou en direction d'une solution de peptides chimiotactiques (WKYMVm) par rapport à en direction d'une solution véhicule. N = 15 pour le foie, n = 4 pour le poumon et n = 4 pour le WKYMVm. **p < 0.01 Un test de student de t a été effectué. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard. La moyenne de cellules par expérience est de 124 cellules.

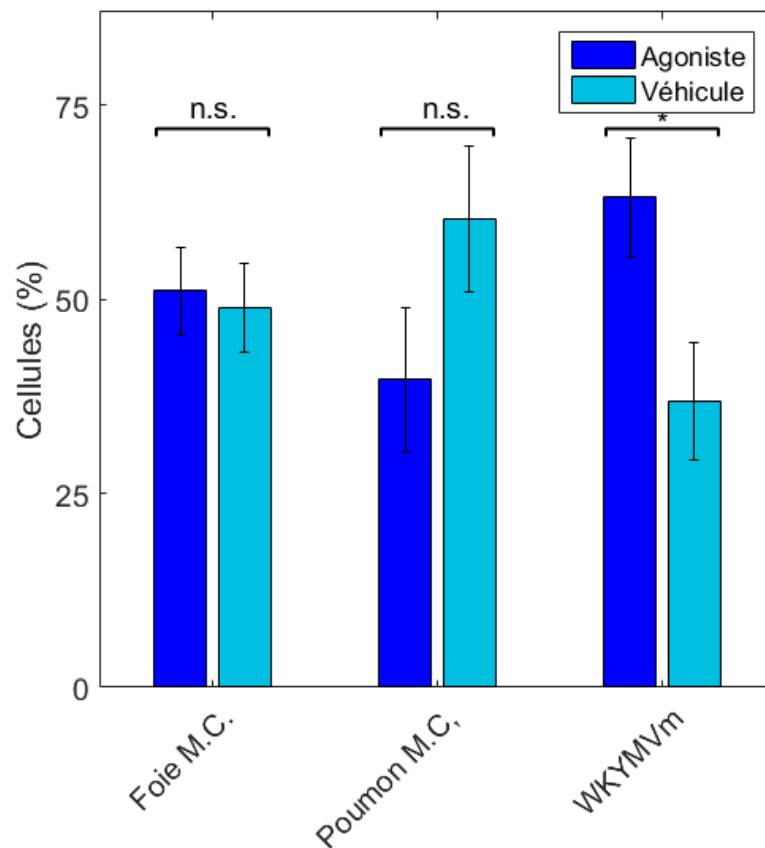


Figure 31. **Pourcentage des HDNs migrant vers les gradients**

Pourcentages des cellules ayant migré pendant 2 heures en direction d'un milieu conditionné provenant de métastases de foie (Foie M.C.), de poumon (Poumon M.C.) ou en direction d'une solution de peptides chimiotactiques (WKYMVm) par rapport à en direction d'une solution véhicule. N = 15 pour le foie, n = 4 pour le poumon et n = 6 pour le WKYMVm. **p < 0.01 Un test de student de t a été effectué. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard. La moyenne de cellules par expérience est de 115 cellules.

Tableau III. Ratio de cellules sortant vers l'agoniste ou vers le véhicule

Réplique	Foie		Poumon		WKYMVm	
	LDNs	HDNs	LDNs	HDNs	LDNs	HDNs
1	2,13	11,00	1,05	0,58	2,05	0,45
2	0,62	0,53	0,93	0,32	1,45	2,75
3	1,56	4,67	0,55	0,45	1,35	1,72
4	2,45	0,40	0,80	2,00	1,80	38,00
5	1,03	0,77				1,21
6	1,25	0,90				1,24
7	1,33	3,72				2,00
8	1,76	1,18				
9	1,54	0,91				
10	0,94	1,93				
11	43,00	0,77				
12	0,61	1,07				
13	3,92	0,74				
14		0,04				
15		1,00				
Moyenne	4,78	1,97	0,83	0,84	1,66	6,77
Médiane	1,54	0,91	0,86	0,52	1,62	1,72

Tableau IV. Décompte absolu de LDNs sortant vers l'agoniste ou vers le véhicule

Réplique	Foie		Poumon		WKYMVm	
	Agoniste	Véhicule	Agoniste	Véhicule	Agoniste	Véhicule
1	100	47	546	275	43	21
2	71	115	434	180	55	38
3	178	114	52	86	69	51
4	164	67	45	124	54	30
5	545	530				
6	395	315				
7	380	285				
8	374	212				
9	517	336				
10	322	341				
11	43	1				
12	48	79				
13	47	12				

Moyenne	245	189	269	166	55	35
Médiane	178	115	243	152	55	34

Tableau V. Décompte absolu de HDNs sortant vers l'agnosite ou vers le véhicule

Réplique	Foie		Poumon		WKYMVm	
	Agoniste	Véhicule	Agoniste	Véhicule	Agoniste	Véhicule
1	22	2	183	316	5	11
2	10	19	94	297	22	8
3	28	6	65	144	55	32
4	20	50	74	37	38	1
5	288	374			63	52
6	164	183			67	54
7	134	36			42	21
8	162	137				
9	209	230				
10	260	135				
11	41	53				
12	80	75				
13	42	57				
14	1	23				
15	8	8				
Moyenne	98	93	104	199	42	26
Médiane	42	53	84	221	42	21

Les LDNs migrent en direction du milieu conditionné de foie

Pour donner suite à ces analyses mesurant de manière statique la chimiotaxie, nous avons examiné plus en détail la réponse des LDNs et des HDNs au milieu conditionné provenant de métastases de foie. Nous avons filmé pendant deux heures la migration des cellules en prenant des images séquentielles toutes les 35 secondes. Nous avons détecté automatiquement les cellules par traitement d'image et suivi les trajectoires dans le temps (Figure 32 et Film 6). En représentant les trajectoires relativement à leur point d'origine, nous observons que les trajectoires des LDNs tendent à se regrouper dans les premier et quatrième quadrants,

particulièrement les LDNs mis en présence de milieu conditionné. Au contraire, les trajectoires des HDNs sont dispersées et couvrent une plus grande surface sur les quadrants.

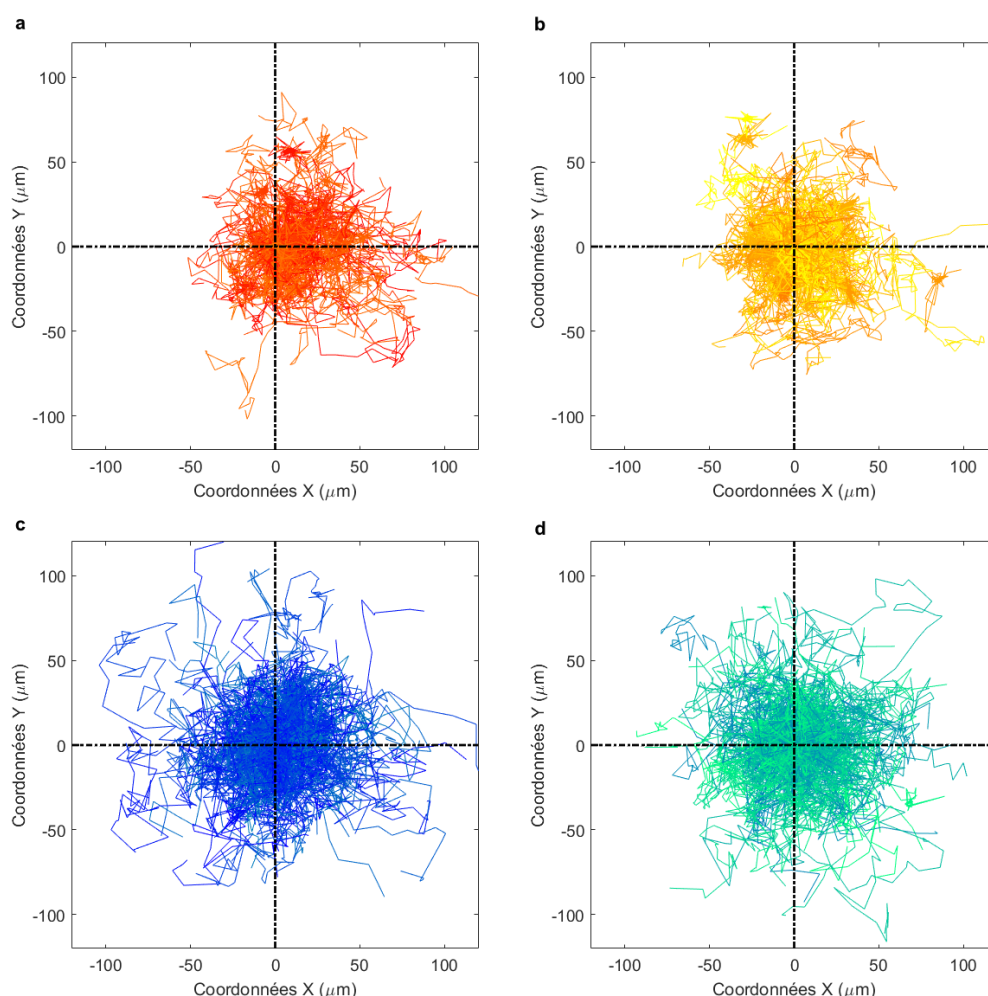


Figure 32. Trajectoires des HDNs et des LDNs

Le tracé des trajectoires des HDNs et des LDNs détectés automatiquement est représenté en transposant les coordonnées de départ de chaque trajectoire à une coordonnée d'origine référentielle. **(a)** Les LDNs migrent vers le milieu conditionné provenant de métastases de foie. **(b)** Les LDNs migrent vers une solution véhicule. **(c)** Les HDNs migrent vers le milieu conditionné provenant de métastases de foie. **(d)** Les HDNs migrent vers une solution véhicule. Les trajectoires proviennent d'une expérience représentative.

Cette distribution dans l'espace s'observe aussi en représentant l'orientation de chaque pas de trajectoire sur un histogramme polaire (Figure 33). De la même manière que pour la Figure 32, les pas des trajectoires se regroupent en direction du gradient, entre les angles 0° et 60° ou 300° et 360° . Ceci est particulièrement vrai pour les LDNs soumis à un gradient de milieu

conditionné, où 36.28 % des pas sont contenus dans ces intervalles, comparativement à 34.46 % (LDNs Véh.), 34.46 % (HDNs, C.M.) et 34.57 % (HDNs, Véh.) pour les autres conditions.

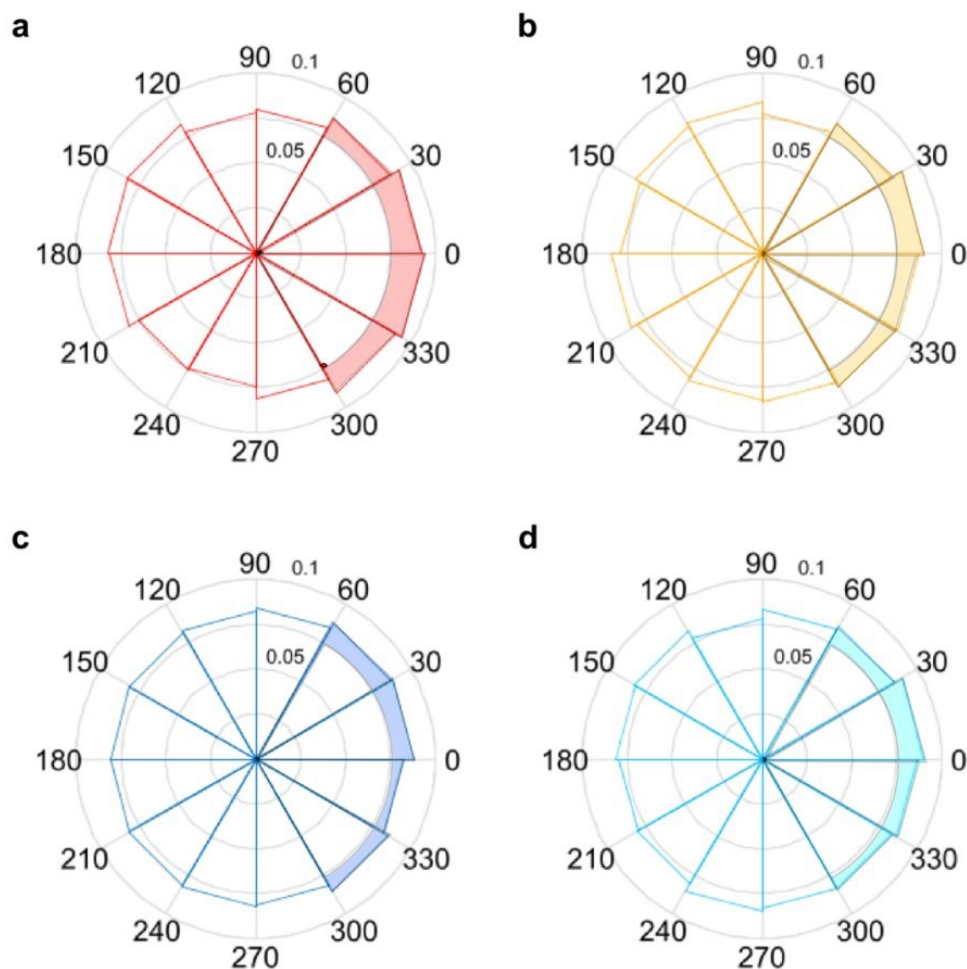


Figure 33. **Orientation des pas des trajectoires**

L'angle entre la direction du gradient et le vecteur de direction de chaque pas des trajectoires a été calculé et représenté dans un histogramme polaire. **(a)** Les LDNs migrent vers le milieu conditionné provenant de métastases de foie. **(b)** Les LDNs migrent vers une solution véhicule. **(c)** Les HDNs migrent vers le milieu conditionné provenant de métastases de foie. **(d)** Les HDNs migrent vers une solution véhicule. Les histogrammes contiennent tous les pas détectés de 12 expériences combinées.

Analyse comparative de différents indices de migration

Nous avons calculé l'indice de chimiotaxie classique de migration frontale *FMI* (« Forward Migration Index ») selon la formule suivante :

$$FMI = \frac{y_{end} - y_1}{l_i} \quad (\text{Eq.6})$$

où y est la coordonnée du déplacement dans la direction du gradient

et où :

$$l_i = \sum_{i=2}^{n_{steps}} ((x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2)^{1/2} \quad (\text{Eq. 9}).$$

La distribution des indices selon les conditions expérimentales s'accorde avec l'orientation des pas dans l'espace ainsi qu'avec la position des trajectoires dans les quadrants (Figure 34). En effet, nous avons obtenu le plus grand des indices pour les LDNs en présence de milieu conditionné. Les indices obtenues sont faibles, ce qui est probablement dû au regroupement de plusieurs expériences dans le calcul, augmentant la variation.

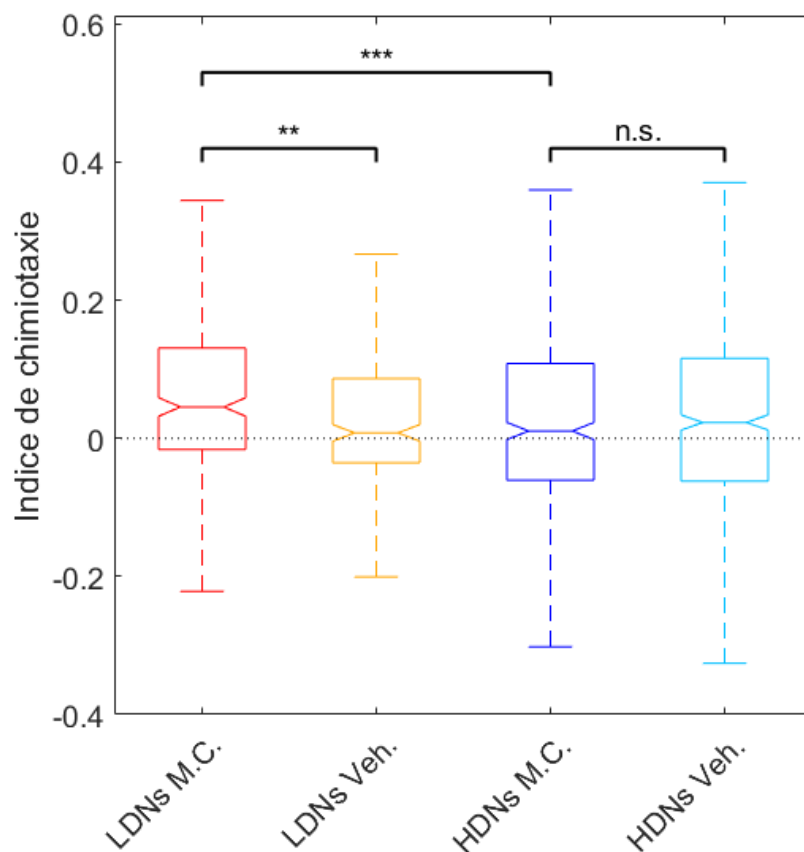


Figure 34. **Indice de migration frontale**

Diagrammes en boîte des indices de chimiotaxie calculés pour les LDNs et les HDNs migrant vers le milieu conditionné de foie (M.C.) ou vers un véhicule (Véh.). Un modèle généralisé mixte associé à une distribution normale a été effectué pour tester les différences entre les groupes. ** $p < 0.01$,

*** $p < 0.001$. n.s., non significatif. Les distributions considèrent tous les pas détectés de 12 expériences combinées.

Compte tenu de la récente critique des forces et des faiblesses des différents indices de chimiotaxie par le groupe de Rink *et al.* (2015), nous avons calculé, en plus du *FMI*, l'indice de migration latérale *SMI* (« Side Migration Index »), l'indice de précision dans la chimiotaxie *CPI* (« Chemotactic Precision Index ») et la précision dans la direction *DI* (« Directness ») (Figure 35 et Tableau VI). Les indices ont été calculés suivant la terminologie définie par Rink *et al.* (2015) :

$$SMI = \frac{x_{end} - x_1}{l_i} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$DI = \frac{((x_{end} - x_1)^2 + (y_{end} - y_1)^2)^{1/2}}{l_i} \quad (\text{Eq. 8})$$

et

$$CPI = \frac{FMI^2}{DI} \times (1 - |SMI|) = FMI \times \cos^2 \phi \times (1 - |SMI|) \quad (\text{Eq. 10}).$$

où ϕ est l'angle entre le *FMI* et *DI*. Afin de comparer l'essai classique en diffusion et l'essai d'haptotaxie, nous avons défini la direction frontale comme étant l'axe radial du puits, ignorant la direction du gradient lié au substrat. Nous avons pris la liberté d'exprimer le *SMI* en valeur absolue, afin d'éviter que les mouvements de directions opposées se neutralisent.

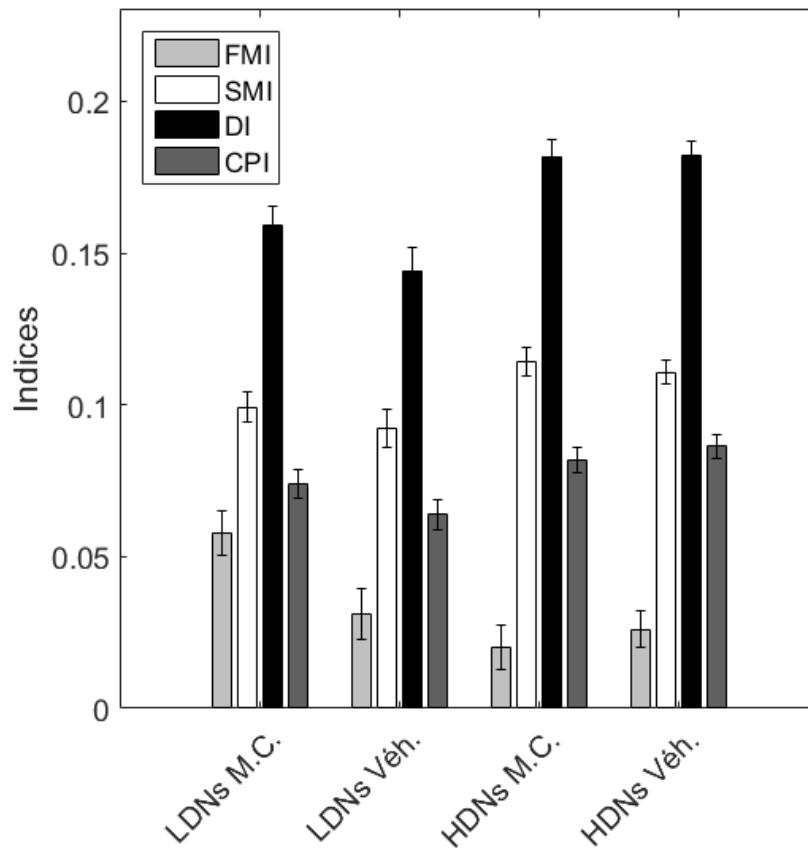


Figure 35. **Comparaison des indices de chimiotaxie**

L'indice de migration frontale *FMI* (« Forward Migration Index »), l'indice de migration latérale *SMI* (« Side Migration Index »), l'indice de précision dans la chimiotaxie *CPI* (« Chemotactic Precision Index ») et la précision dans la direction *DI* (« Directness ») ont été calculés pour les LDNs et les HDNs migrant vers le milieu conditionné de foie (M.C.) ou vers un véhicule (Véh.). Les indices considèrent $n = 12$ expériences combinées.

Tableau VI. Valeur de p calculée selon le test U de Mann-Whitney

	FMI	SMI	D	CPI
LDNs M.C. - LDNs Véh.	0,0027 (*)	0,1126	0,0093 (*)	0,0227 (*)
HDNs M.C. - HDNs Véh.	0,3968	0,4407	0,8212	0,3583
LDNs M.C. - HDNs M.C.	0,0004 (*)	0,0466 (*)	0,0077 (*)	0,8782

Pour réellement représenter la chimiotaxie, le groupe précise que le FMI doit être élevé alors que le SMI doit être faible. Lorsque ces deux conditions sont remplies, les cellules migrent plus particulièrement en direction du gradient que dans la direction opposée. Dans la Figure 35, pour

les LDNs en présence de milieu conditionné, on observe en effet que le FMI est élevé alors que le SMI est bas, par rapport aux autres conditions. De la même manière, le CPI est élevé. Ceci confirme donc l'effet chimiotactique du milieu conditionné sur les LDNs. Pour les HDNs, au contraire, les FMI sont bas alors que les SMI sont élevés, peu importe qu'ils migrent vers le milieu conditionné ou vers le véhicule. Ceci indique une absence de chimiotaxie. Toutefois, les CPI des HDNs aussi sont élevés en présence de milieu conditionné.

Les HDNs migrent plus rapidement que les LDNs

Nous avons calculé la vitesse moyenne des trajectoires en fonction des conditions expérimentales (Figure 36). De la même manière que dans la Figure 35 où les trajectoires des HDNs étaient plus étendues dans l'espace, la vitesse moyenne des HDNs est plus élevée que celle des LDNs. Les vitesses, tant des LDNs que des HDNs, sont plus élevées lorsque les cellules sont en présence de milieux conditionnés que lorsqu'elles sont en présence de solutions véhicules (11.64 $\mu\text{m}/\text{min.}$ vs 10.29 $\mu\text{m}/\text{min.}$ et 14.75 $\mu\text{m}/\text{min.}$ vs 14.33 $\mu\text{m}/\text{min.}$, respectivement). Il est difficile d'établir un lien entre ces différences et leur importances cliniques.

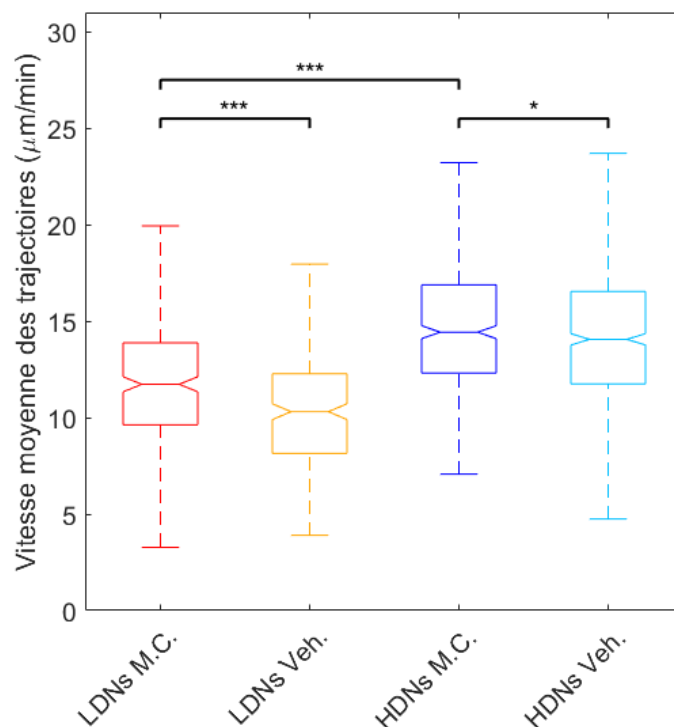


Figure 36. **Vitesse moyenne des trajectoires**

Diagrammes en boîte des vitesses moyennes des trajectoires calculées pour les LDNs et les HDNs migrant vers le milieu conditionné de foie (M.C.) ou vers un véhicule (Véh.). Un modèle généralisé mixte associé à une distribution normale a été effectué pour tester les différences entre les groupes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Les distributions considèrent tous les pas détectés de 12 expériences combinées.

L'implication de C3a et de son récepteur dans la réponse chimiotactique

Nous avons cherché à déterminer la ou les molécules chimiotactiques présentes dans le milieu conditionné de foie auxquelles répondaient les LDNs. Nos collaborateurs ont mesuré plus d'expression du récepteur au C3a chez les LDNs que chez les HDNs (données non-publiées). De plus, ils ont détecté le C3 à une forte concentration dans le milieu conditionné de foie comparativement à celui de poumon. Ces résultats nous ont menés à tester le potentiel chimiotactique du C3a (Figure 37 et Figure 38). Nos données démontrent que, non seulement les LDNs répondent au C3a, mais que, lorsque nous inhibons le récepteur au C3a, les LDNs ne migrent plus spécifiquement ni vers le C3a ni vers le milieu conditionné de foie. Nous avons aussi contrôlé que même en inhibant le récepteur au C3a, les LDNs répondaient toujours au C5a.

Finalement, les HDNs ne répondent pas de manière chimiotactique au C3a, mais uniquement au C5a.

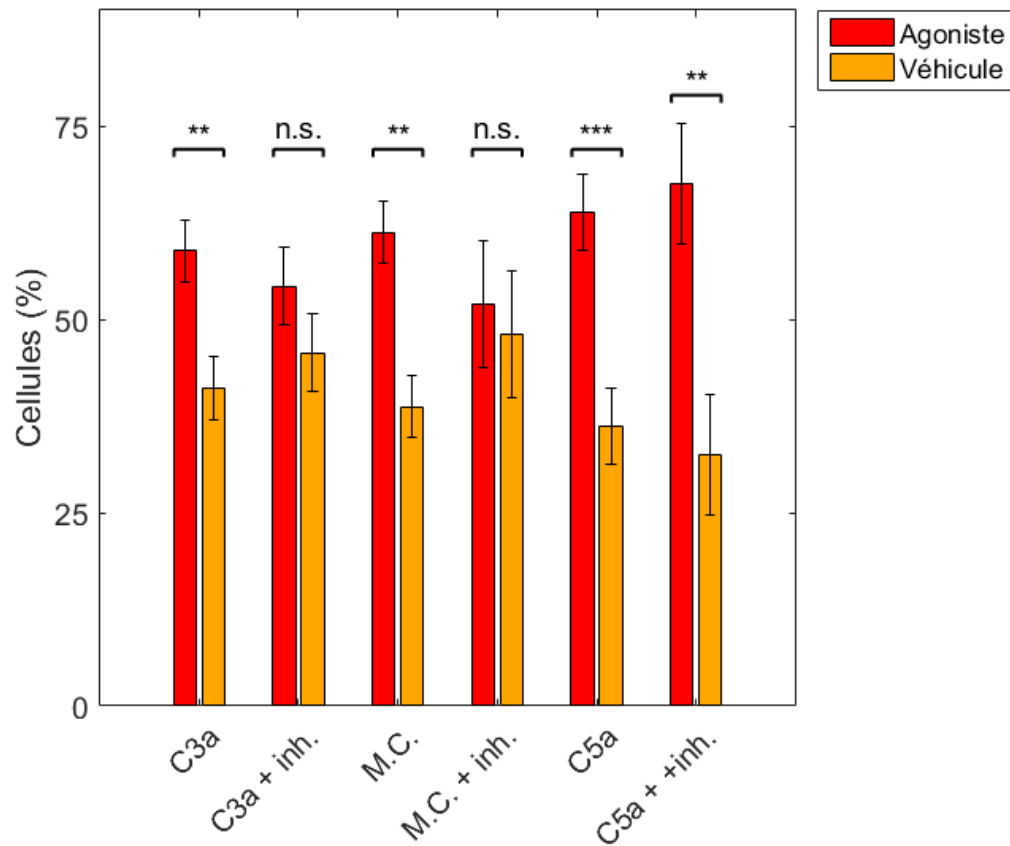


Figure 37. Réponse des LDNs au C3a et C5a

Pourcentages des cellules ayant migré pendant 2 heures en direction d'un gradient de C3a, de milieu conditionné provenant de métastases de foie (M.C.) ou de C5a par rapport à en direction d'une solution véhicule. Les résultats présentent des cellules non traitées et des cellules traitées préalablement avec un inhibiteur des récepteurs au C3a (+ inh.). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (test de student). n.s., non significatif. N = 11 pour C3a, n = 13 pour C3a+inh., n = 16 pour M.C., n = 11 pour M.C. + inh., n = 6 pour C5a, n = 6 pour C5a + inh.

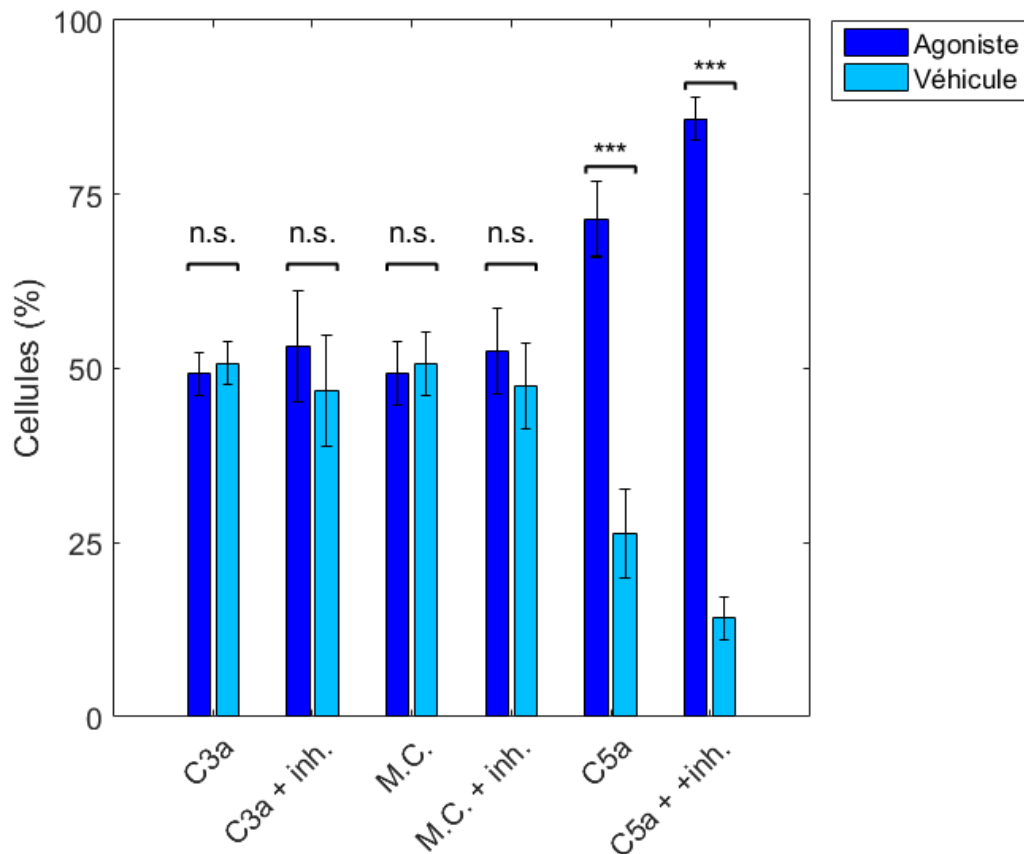


Figure 38. **Réponse des HDNs au C3a et C5a**

Pourcentages des cellules ayant migré pendant 2 heures en direction d'un gradient de C3a, de milieu conditionné provenant de métastases de foie (M.C.) ou de C5a, par rapport à en direction d'une solution véhicule. Les résultats présentent des cellules non traitées et des cellules traitées préalablement avec un inhibiteur des récepteurs au C3a (+ inh.). *** $p < 0.001$ (test de student). n.s., non significatif. N = 8 pour C3a, n = 12 pour C3a+inh., n = 19 pour M.C, n = 11 pour M.C. + inh., n = 6 pour C5a, n = 5 pour C5a + inh.

Compte tenu de la grande variabilité observé dans les essais de migrations, nous avons comparé les morphologies cellulaires en présence de différents signaux (Figure 39). Après deux heures de migration, les cellules semblent encore saines, comme le démontre la forme allongée des cellules. Toutefois, il est à noter que les cellules démontrent une plus grande polarisation en présence de WKYMVm et C5a qu'en présence de milieu conditionné ou de solution véhicule. C'est aussi avec le C5a que la réponse chimiotactique est la plus prononcée (Figure 37 et Figure 38). Il serait intéressant d'utiliser les neutrophiles provenant de la moelle osseuse comme contrôle positif de l'état général des neutrophiles suivant les procédures d'extractions.

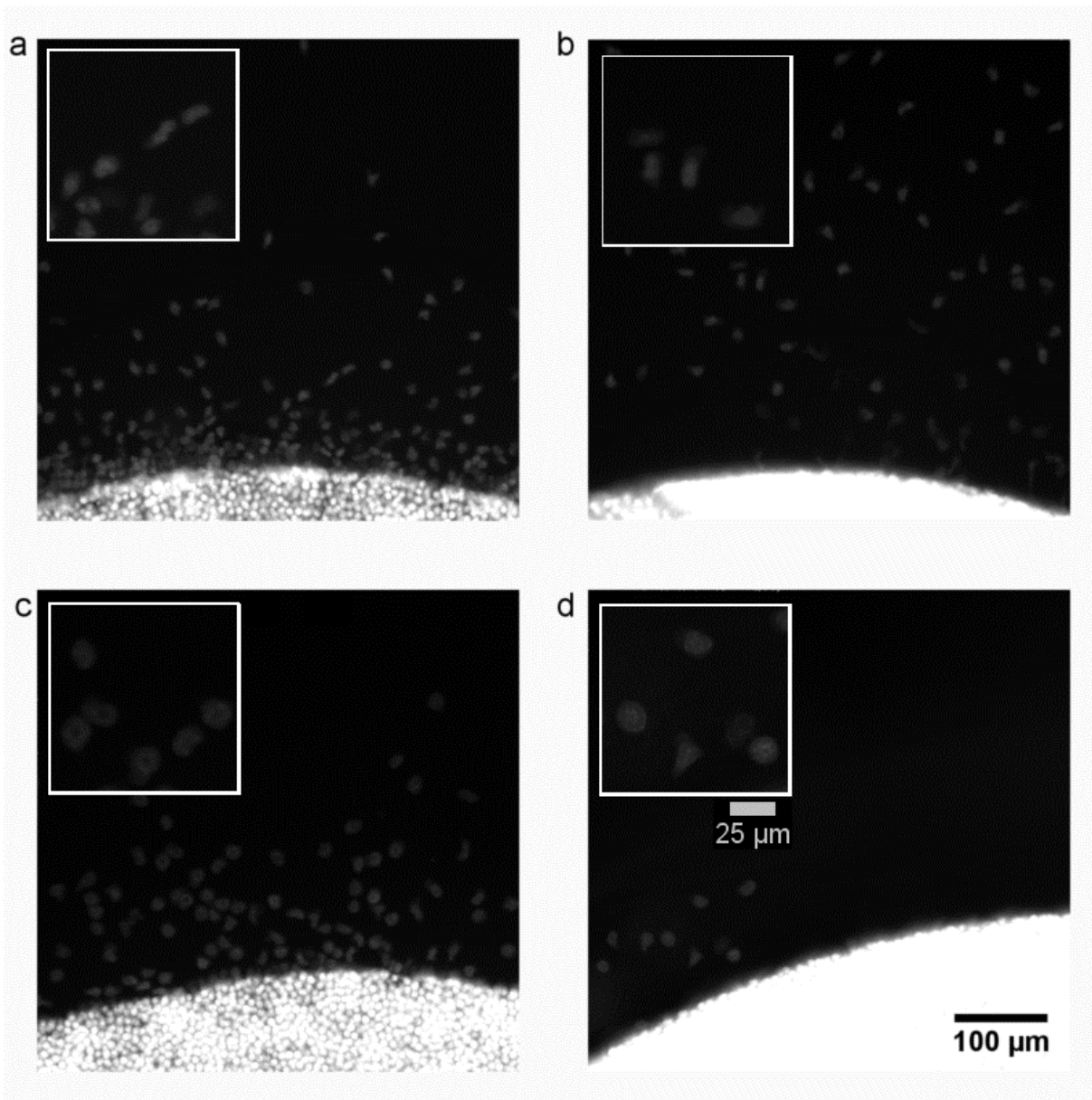


Figure 39. **Morphologies des LDNs en réponse à différents signaux**

Les LDNs montrent une morphologie plus ou moins polarisée en fonction des différents signaux auxquelles ils sont en présence après 2 heures de migration sous agarose. Ils sont particulièrement polarisés face au WKYMVm et au C5a. **(a)** WKYMVm, 10 nM. **(b)** C5a 0.1 ug/ml. **(c)** milieu conditionné de métastase de foie. **(d)** solution véhicule. Les cellules sont colorés avec le LDS751 qui marque l'ADN. Même si c'est principalement le noyau qui est marqué, la morphologie et la polarisation de la cellule entière est reconnaissable.

Discussion

Le milieu conditionné produit par les cellules cancéreuses isolées du foie est chimiotactique pour les LDNs mais pas pour les HDNs. Ceci contraste avec les résultats de Granot *et al.* (2011) qui stipulaient que la chimiotaxie des LDNs était faible, montrant que les LDNs migraient en plus petite quantité vers le surnageant de carcinome de 4T1. Nous expliquons cette disparité en rappelant que, dans nos résultats, le potentiel chimiotactique de milieux conditionnés est organe spécifique. En effet, pour le même modèle tumoral, le milieu conditionné provenant des poumons n'est pas chimiotactique ni pour les LDNs ni pour HDNs.

En plus d'être organe ou modèle spécifique, les différences observées peuvent s'expliquer par le type d'essai de migration utilisé. En effet, dans le contexte de migration de cellules cancéreuses, Weiger *et al.* (2013) ont montré que l'évaluation de la réponse chimiotactique différait en fonction de l'utilisation d'un essai statique, ou de l'utilisation d'un essai d'invasion dynamique dans le temps. Nous avons nous-mêmes observé dans nos analyses qu'il ne suffit pas de comparer le nombre de cellules quittant le puits pour décrire adéquatement la chimiotaxie. En effet, par exemple, le suivi dynamique des trajectoires a permis de montrer que même si les HDNs ne répondaient pas au milieu conditionné, elles étaient en générales plus rapides que les LDNs.

En calculant les indices de chimiotaxie, nous avons mis en évidence des différences entre le FMI et le CPI. Rink *et al.* (Rink, *et al.* 2015), discutent certaines études de cas spécifiques exposant les forces et les faiblesses des divers indices, mais ils n'explorent pas spécifiquement le cas qui nous intéresse. Nous croyons que dans notre cas, la chimiotaxie est mieux décrite en rapportant côte à côte le FMI et le SMI, plutôt que de ne rapporter que le CPI.

Les HDNs migrent plus rapidement que les LDNs, démontrant une plus forte propension à la chimiokinésie. Il semble que le milieu conditionné de foie exacerbe légèrement cette tendance. Il est possible que les deux types de cellules ne favorisent pas les mêmes voies de signalisation. Par exemple, Heit *et al.* (2008) montrent que des neutrophiles knock-out pour PTEN migraient en plus grand nombre vers le CXCL2, mais de manière aléatoire. Le groupe expliquait cette dualité par une plus grande activité de PI(3)K. Dans notre cas, ces différences dans les voies de signalisation restent à déterminer. Une analyse de données de séquençage d'ARN est en cours.

Nous avons déterminé que le C3a était probablement le candidat responsable de la réponse des LDNs au milieu conditionné de foie. Contrairement au C5a, le C3a n'est pas traditionnellement perçu comme étant chimiotactique. Toutefois, la concentration de cette molécule est connue pour être plus élevée dans le sérum des patients atteints de cancer du sein que chez les patients en bonne santé (Chung, et al. 2014). Un autre groupe a démontré une corrélation positive entre le nombre de LDNs et l'hypercoagulation dans un modèle de tumeur intestinale et que cette corrélation serait dépendante de l'engagement des récepteurs au C3a (Guglietta, et al. 2016). Finalement, Nabizadeh *et al.* ont trouvé qu'en inhibant le récepteur au C3a, la croissance de mélanome, était stimulée et que les neutrophiles étaient au cœur de cette réponse (Nabizadeh, et al. 2016). Ces informations, combinées à nos propres résultats, confirment l'implication de C3a et de son récepteur dans les processus protumoraux.

Le milieu conditionné de métastase de foie est composé de signaux de différents types et tailles. Certains, telles les exosomes d'une tailles imposantes de 30 à 120 nm ou des microvésicules (120-1000 nm), diffusent beaucoup plus lentement que d'autres. Ces dernières peuvent servir de véhicules aux molécules chimiotactiques, tels le LTB₄ (Majumdar, et al. 2016; Sung, et al. 2015). De plus, la composition du milieu peut être complexe et contenir des signaux jouant des rôles opposés, dont des molécules chimiorépulsives (Lowry, et al. 2015). Il est donc difficile d'établir le rôle de chacune des molécules présentes individuellement. Une analyse plus poussée des composantes de notre milieu conditionné provenant de métastases de foie s'impose. De plus, des techniques alternatives d'essais de chimiotaxie pourraient compléter nos analyses de chambre sous-agarose. La microfluidique permettrait probablement un profil de gradient de concentration d'un plus grands types de molécules, puisque que la diffusion ne serait pas limitée par les pores de l'agarose. De plus, nous considérons fonctionnalisé le substrat de culture par un laser, selon la technique du LAPAP. Avec cette approche, en biotinylant de manière non-spécifique le milieu conditionné, il est possible d'attacher ses composantes, sous forme de gradient, sur un motif de streptavidine (Roy, et al. 2017).

Finalement, les neutrophiles de basse densité sont associés aux pathologies inflammatoires comme le cancer, mais aussi le lupus et l'asthme (Denny, et al. 2010; Herteman, et al. 2017). Les rôles précis des LDNs, tant dans les pathologies que chez les individus sains, restent encore

à être élucidés. Nos résultats de chimiotaxie s'ajoutent au portrait pro-inflammatoire de ces cellules dépeint dans la littérature.

Légende du film

Film 6. Trajectoires des LDNs et HDNs migrant vers le milieu conditionné de foie (C.M.) ou un véhicule (Veh). Échelle : 100 μm . Le film montre environ le quart du champ microscopique. Étiquette du temps : hh:mm:ss. La fréquence vidéo est de 30 images/seconde.

Section 3. Détection de phénotypes migratoires de cellules cancéreuses

Avant-propos

Les résultats présentés dans la section suivante ne sont pas publiés. Essentiellement, ils sont le fruit d'une optimisation de protocole toujours en cours. Ce chapitre se veut un résumé des résultats obtenus jusqu'à maintenant.

L'objectif de ce projet est de fonctionnaliser les membranes cellulaires de la même manière que j'ai fonctionnalisé les substrats de culture, afin d'isoler des cellules au phénotype migratoire intéressant. La technique, le CLaP, développé par notre groupe en 2015, permet de lier des biotines fluorescentes (B4F) aux membranes par photoblanchiment induit par un laser. Cette technique s'applique à une multitude de questions biologiques, puisqu'on étiquette ainsi une cellule choisie selon des critères visuels variés. On peut donc, au microscope, déterminer que certaines cellules sont différentes des autres et les marquer par le CLaP. J'ai voulu appliquer cette approche à la migration cellulaire afin de distinguer les cellules d'intérêt et d'enrichir certains phénotypes.

Une fois les cellules marquées, différentes méthodes s'offrent pour les séparer des autres. Au-delà de la méthode classique de cytométrie de flux et de l'essor de la microfluidique appliquée au tri cellulaire, nous avons développé un protocole de tri basé sur les billes magnétiques ainsi qu'un deuxième protocole basé sur le pouvoir relatif de résistance à la dissociation cellulaire. Dans cette section, je présente mon hypothèse de travail, suivi d'une évaluation de l'efficacité du marquage et du tri cellulaire.

Hypothèse de travail

Les MDA-MB-231, cellules de carcinome mammaire, servent de modèle à l'étude de l'invasion d'organes distants menant aux métastases. C'est aussi une lignée caractérisée par la migration de cellules individuelles, comparativement aux lignées migrant préférentiellement ou exclusivement de manière collective ou en feuillet (Clark and Vignjevic 2015). Notre hypothèse de travail suppose que le potentiel invasif, dont le potentiel à migrer, est hétérogène dans une

même population. *In vivo*, l'hétérogénéité est principalement dictée par l'environnement entourant les cellules, dont des gradients de signaux chimiotactiques sécrétés et des signaux physiques de la matrice (Clark and Vignjevic 2015). Toutefois, une part de l'hétérogénéité est aussi intrinsèque à la diversité de clones présents dans une population (Clark and Vignjevic 2015). Ainsi, dans un environnement contrôlé, *in vitro*, la diversité des phénotypes migratoires peut être étudiée de manière isolée. Nous avons donc établi un protocole permettant d'établir l'hétérogénéité des phénotypes migratoires et d'isoler les cellules d'intérêt pour en étudier leur génome.

Facteurs limitants considérés

Plusieurs facteurs limitent l'implémentation de ce protocole, dont certains imposent des compromis face aux autres conditions expérimentales. Lors des phases d'optimisation, nous avons établi les meilleures conditions de culture, les temps d'analyse d'images à respecter, les conditions et le temps alloués au CLaP et finalement, les conditions expérimentales de tri cellulaire.

Les cellules sontensemencées à faible densité dans de petites chambres de culture, environ 600 cellules par chambre, afin de pouvoir distinguer les cellules les unes des autres lors de l'analyse d'images et du marquage par le CLaP. Ce nombre de cellules suffit à l'observation de l'hétérogénéité tout en limitant le nombre de trajectoires et en permettant un ratio élevé de cellules marquées. Les cellules sont cultivées pendant 24h dans un milieu sans sérum afin de synchroniser leur cycle cellulaire et d'éviter l'observation de divisions cellulaires. En effet, lors de celles-ci, les cellules ne migrent pas, ce qui crée artificiellement une variabilité de phénotype. La migration spontanée est ré-établie par l'ajout de sérum. Compte tenu de la vitesse moyenne des cellules (3-4 $\mu\text{m}/\text{minutes}$), l'obtention de longues trajectoires nécessite plusieurs heures. Le protocole prévoit donc la migration de nuit, pendant 15 heures, ce qui permet ainsi de marquer les cellules le lendemain.

Comme une partie de l'analyse d'image se fait en temps réel, pendant la migration, nous avons dû optimiser l'algorithme de segmentation pour réduire le temps d'analyse au minimum. Le compromis actuel permet la segmentation en 3 à 4 secondes par image, à une densité de 200 cellules/ mm^2 ensemencées dans 4 chambres de 3 mm^2 , à raison de 4 régions d'intérêts

photographiées par chambre. En fonction de la vitesse de migration, et de la distance moyenne entre chaque cellule, nous avons convenu que l'intervalle de temps optimal entre chaque acquisition était de 60 secondes. Le temps d'analyse du suivi des trajectoires prend une heure, temps suffisamment court pour éviter que les cellules ne se déplacent trop entre l'arrêt de l'acquisition d'images et le marquage au CLaP basé sur les coordonnées de la cellule dans la dernière image.

Une fois l'analyse terminée, le choix des cellules à marquer se fait en partie manuellement, par observation des trajectoires superposés aux films des cellules migrants. La vitesse et l'élongation des trajectoires sont représentés selon un code de couleur. Compte tenu du temps nécessaire au choix de cellules (quelques secondes à quelques minutes par cellule) et du temps nécessaire au marquage par CLaP (quelques secondes par cellule), il est raisonnable de choisir environ 50 à 60 cellules par chambre, correspondant à 8 à 10 % des cellules d'une chambre.

Méthodologie

Culture des cellules cancéreuses

Les MDA-MB-231 proviennent d'un don du Dr Peter Siegel. Elles ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM, supplémenté avec 10 % de FBS, des acides aminés non essentiels (NEAA, Gibco) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Gibco) dans un environnement à 37 °C contenant 5 % de CO₂.

Pour les essais de migration spontanée, nous avons inoculé les cellules dans des inserts de culture en silicone (Ibidi) placés sur des pétris de 35 mm de diamètre dont le fond était monté d'une lamelle de plastique traitée pour l'adhérence (Ibidi). Chacune des 4 chambres de l'insert mesurait 1.5 x 2 mm et chaque chambre contenait 10 µl. La région du pétri extérieure à l'insert était remplie de PBS afin d'éviter l'évaporation. Au premier jour, les cellules étaient inoculées avec une densité de 100 cellules par mm² dans un milieu de culture Leibovitz's (L-15, Life Tech) supplémenté avec 10 % de FBS et des antibiotiques dans un environnement à 37 °C à ~ 0 % de CO₂. Une fois que les cellules avaient bien adhéré, au deuxième jour, nous avons remplacé le milieu par du L-15 sans FBS afin de synchroniser le cycle cellulaire. Après 24

heures de ce jeûne, au troisième jour, les cellules ont été stimulées afin de relancer la migration aléatoire en rajoutant du FBS.

Acquisition d'images

Les cellules MDA-MB-231 ont été photographiées en microscopie à fond clair chaque minute pendant 15 heures avec une caméra à CCD Retiga 2000 montée sur un microscope inversé Olympus équipé d'un objectif de 10X. La plateforme motorisée et la caméra étaient contrôlées par le programme MetaMorph (Molecular Devices). Typiquement, 4 positions par condition étaient enregistrées en parallèle, pour un total de 4 conditions et 16 positions.

Détection et suivi des trajectoires

Nous avons développé un script MATLAB (MathWorks,) pour l'analyse d'image, la détection des cellules, le suivi et l'analyse des trajectoires générées. La détection des cellules est réalisée par une série d'opérations qui débute par l'application à l'image d'un filtre, basé sur la déviation standard à l'intérieur d'un élément structurant circulaire qui la balaye. Par la suite, nous avons appliqué un seuil de Otsu (1979) à partir de cette image filtrée. Une ouverture morphologique suivie d'une fermeture morphologique ont permis de conserver les objets de la taille moyenne d'une à cinq cellules. Lorsque les grands objets avaient une solidité basse, nous supposons qu'ils correspondaient à plusieurs cellules et donc, ils étaient partitionnés par l'algorithme « K-means++ » (Arthur and Vassilvitskii 2007), de telle sorte que la somme de l'intensité des pixels soit minimisée. Cette partition était ensuite segmentée par une transformée de Watershed (Meyer 1994). La solidité est définie comme l'aire d'un objet divisé par l'aire du plus petit polygone contenant cet objet.

Nous avons déterminé les trajectoires des cellules par une approche des plus proches voisins (« Nearest-neighbor »), où l'on minimise globalement la distance totale liant les objets des trajectoires. Nous avons modifié l'algorithme de u-track (Jaqaman, et al. 2008b) en optimisant localement le rayon de recherche maximal par un calcul de la moyenne spatio-temporelle (Mazzaferri, et al. 2015).

Fonctionnalisation de membranes cellulaires (CLaP)

Nous avons fonctionnalisé les membranes de cellules cancéreuses MDA-MB-231 avec de la biotine liée à de la fluorescéine (B4F, Sigma Aldrich) par la méthode CLaP (Binan, et al. 2016a; Binan, et al. 2016b), inspirée de l'approche LAPAP. Les cellules en culture étaient premièrement immergées dans une solution de biotine fluorescéine (B4F) (milieu de culture L15 avec 10% FBS, 0.05 mg/ml B4F) et ensuite placées sur un microscope inversé muni d'un incubateur à 37 °C. Le microscope était modifié de telle sorte qu'un miroir permettait de faire parvenir un laser d'une longueur d'onde de 473 nm focalisé à la surface des cellules. Nous avons varié la position du point focal du laser sur la culture en déplaçant la plateforme motorisée du microscope à l'aide d'un logiciel de programmation LabVIEW (National Instruments). Nous avons balayé des régions de 40 μm x 40 μm à une puissance de 750 μW à une vitesse de 0.170 mm/s. Nous avons choisi la taille de la région de manière à couvrir la majorité de la surface d'une cellule type sans toucher aux cellules adjacentes. Une fois toutes les cellules d'intérêt illuminées, nous avons lavé trois fois le pétri avec 2 ml de L15 sans FBS afin d'enlever toute trace de biotine libre et de sérum. Pour visualiser les cellules marquées et les zones balayées par le laser, nous avons incubé les pétris avec de la streptavidine-Cy5 (0.05 mg/ml) pendant 15 minutes, suivi de rinçages.

Tri des cellules par dissociation

Les cellules étaient incubées dans une solution de trypsine à 21 μM et de EDTA à 0.48 mM (Gibco)    37  C 5 % de CO₂ jusqu'à ce qu'elles soient rondes, mais toujours à la surface du pétri de culture. Nous avons lentement rempli la chambre de milieu de culture L-15, 10 % FBS, en prenant soin de ne pas détacher mécaniquement l'ensemble des cellules à cause d'un flux de liquide trop puissant. Une série de 2-3 lavages permettait de détacher la majorité des cellules non fonctionnalisées alors que les cellules fonctionnalisées résistaient à la dissociation. Des protocoles alternatifs ont été essayés : concentrations changeantes de trypsine-EDTA, périodes d'incubation différentes et actions mécaniques (pipetages et/ou agitation). Nous avons aussi essayé la dissociation par EDTA (1 à 10mM) ou par la solution saline citrique (135mM chlorure de potassium, 15mM citrate de sodium). Le protocole précédemment mentionné donne les meilleurs résultats.

Tri magnétique de cellules

En plus de trier par dissociation, nous avons aussi séparé les cellules fonctionnalisées des cellules contrôles à l'aide de billes magnétiques (**Error! Reference source not found.**). Après la fonctionnalisation CLaP, nous avons incubé les cellules avec des billes magnétiques liées à la streptavidine (Dynabeads 65305, Thermofisher) à une concentration finale de 1 mg/ml. Après rinçage avec L-15 sans FBS, nous avons dissocié de la surface toutes les cellules par une incubation dans de la trypsine-EDTA de 15 minutes à 37°C 5 % CO₂, suivi d'un léger pipetage pour mettre les cellules en suspension. Nous avons alors procédé à deux tris successifs.

Pour le premier tri, la région du pétri extérieure à l'insert de silicone était asséchée pour permettre l'insertion d'un espaceur annulaire d'un diamètre (intérieur 13 mm, extérieur 15 mm) et d'une hauteur (6 mm) légèrement supérieurs à ceux de l'insert de silicone (diamètre de 12 mm, hauteur de 4.2 mm). Nous avons fabriqué l'espaceur sur mesure à l'aide d'une imprimante 3D Ultimaker 2Go (Ultimaker) et du logiciel FreeCAD. En parallèle, nous avons monté une chambre de PDMS (Sylgard 180, Sigma Aldrich) d'un millimètre de hauteur, de 4 mm de diamètre intérieur et de 20 mm de diamètre extérieur sur une lamelle de verre de 22 mm de diamètre. Un volume d'environ 80 µl de milieu de culture était déposé dans le puits de la chambre de PDMS, formant un ménisque convexe à la surface du puits. De l'autre côté de la lamelle, nous avons assemblé un insert de silicone (Ibidi), un clou de fer et une série d'aimants. Immédiatement après la mise en suspension des cellules dissociées, le montage était déposé sur l'espaceur comme sur le schéma de la Figure 46 afin que les gouttes de chaque chambre se touchent. Après 3 minutes, le montage était soulevé et retourné afin que la chambre de PDMS pointe vers le haut. Le clou, les aimants et l'insert de silicone étaient retirés.

Pour le deuxième tri, la chambre de PDMS était déposée sur un anneau espaceur de 8.5 mm de hauteur, de 15 mm de diamètre intérieur et 18 mm de diamètre extérieur. En parallèle, nous avons assemblé des inserts de silicone (Ibidi) de chaque côté d'un nouveau pétri collecteur (Ibidi). Un clou et des aimants étaient insérés dans l'insert extérieur. Environ 30 µl de milieu conditionné (surnageant centrifugé d'une culture d'un jour de MDA-MB-231) était déposé dans une des chambres de l'insert intérieur de manière à créer un ménisque convexe à sa surface. Ce montage était déposé sur la chambre de PDMS contenant les cellules triées précédemment.

Après 3 minutes de tri, le pétri collecteur était inversé et désassemblé pour permettre la culture des cellules ainsi triées.

Statistiques

Pour tester la valeur statistique du coefficient de corrélation de Pearson (r), nous avons procédé à un test de permutation, où les valeurs du temps 0 étaient permutées aléatoirement à 1000 reprises. Nous avons calculé les coefficients de corrélation pour tous ces données permutées et établi leur distribution. Les coefficients calculés sur les données d'origines étaient considérés comme corrélés positivement s'ils étaient plus grand que 95% de ceux des données permutés (test unilatéral avec un seuil de 0.05).

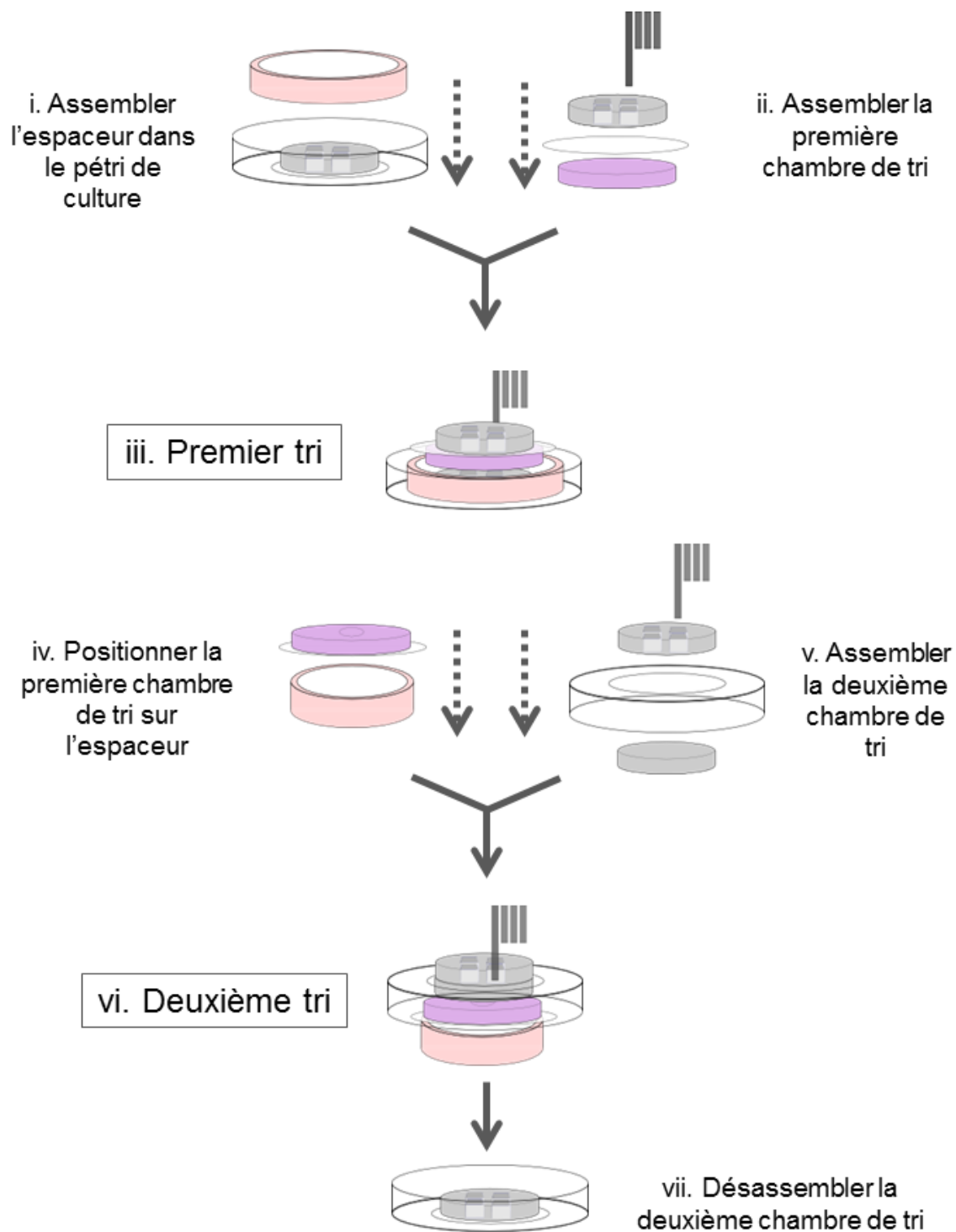


Figure 40. **Procédure de tri magnétique de cellules**

Résultats

Hétérogénéité des phénotypes migratoires

Le protocole décrit précédemment permet d'établir l'hétérogénéité dans la morphologie et le profil migratoire d'une population. Pour une même condition expérimentale, nous pouvons corrélérer l'expression de marqueurs spécifiques à la transition MET, la taille des cellules, leur polarisation, leur vitesse et l'élongation des trajectoires (Figure 41). Nous avons testé l'expression de la e-cadherine comme marqueur de cellules épithéliales et de la n-cadherine comme marqueur de cellules mésenchymateuses. Nous pouvons aussi établir que les cellules sont pour la plupart polarisées, comme l'indique le biais dans l'histogramme de l'excentricité des cellules (Figure 42d). De la même manière, la majorité des cellules ont une taille semblable (Figure 42c), à l'exception d'une faible minorité de grandes cellules. Ces dernières sont souvent peu polarisées, évoquant la sénescence (Figure 41, astérisque). La distribution des vitesses est normale (moyenne de $3.27 \mu\text{m}/\text{minute}$), avec une dispersion large (écart-type de $0.56 \mu\text{m}/\text{minute}$) (Figure 42a). Nous avons calculé différents paramètres décrivant les trajectoires des cellules. Le paramètre A2 décrit l'élongation de la trajectoire. Ainsi, comme l'excentricité décrit la polarisation de la cellule, le A2 superpose une ellipse sur l'ensemble des pas d'une trajectoire. Une valeur de A2 près de 1 correspond donc à une ellipse, ou une trajectoire, allongée. Dans la Figure 42b, nous observons de la variabilité dans les types de trajectoires, avec toutefois un biais vers de grandes valeurs de A2. Il y a donc une persistance dans la direction de la cellule, décrivant une marche aléatoire biaisée.

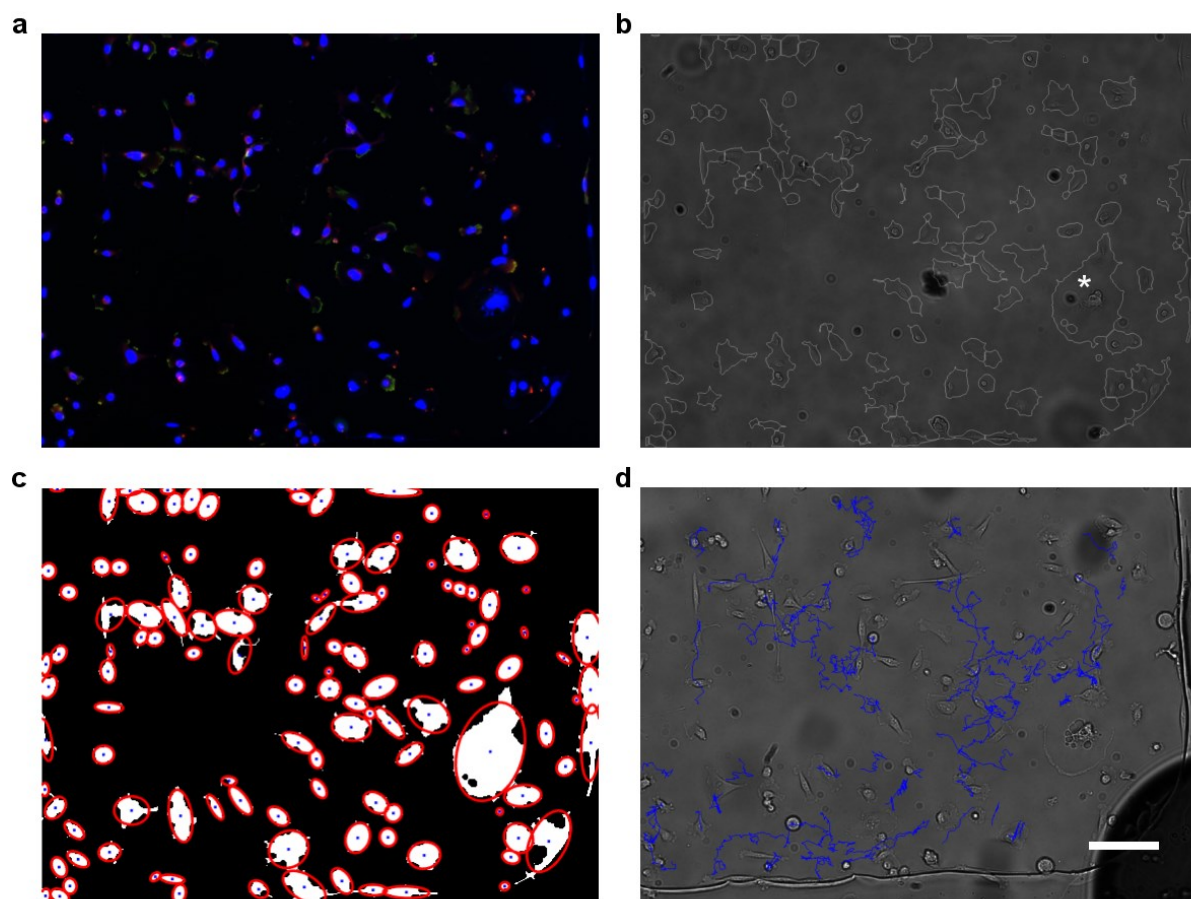


Figure 41. **Correspondances phénotypiques**

Correspondance des caractéristiques morphologiques et migratoires au sein d'une même population. (a) Immunofluorescence avec des marqueurs de transition MET. *En vert* : e-cad. *En rouge* : n-cad. *En bleu* : noyau (dapi). (b) Segmentation du périmètre des cellules. L'astérisque indique une cellule sénescence. (c) Représentation de l'excentricité et de la taille des cellules (*en rouge*) et du centre de gravité de l'objet détecté (*en bleu*). (d) Trajectoires superposées sur l'image finale d'une séquence. Échelle 100 μm .

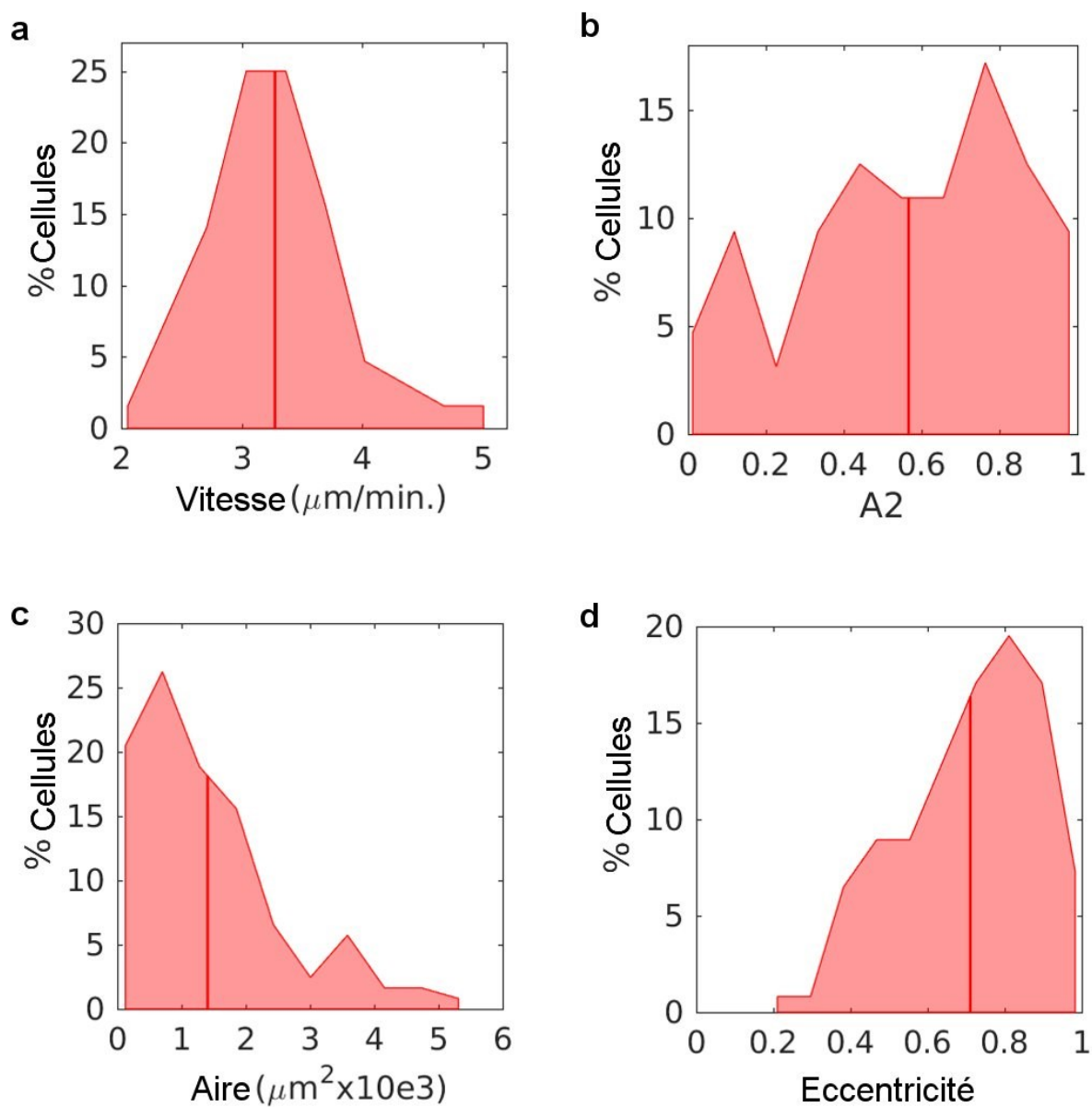


Figure 42. **Hétérogénéité des phénotypes morphologiques et migratoires**

(a) Distribution des vitesses (b). Distribution de l'élongation des trajectoires définie par le paramètre A2. (c) Distribution de la taille des cellules. (d) Distribution de l'excentricité. La ligne rouge représente la moyenne.

Les phénotypes migratoires sont conservés dans le temps

L'hétérogénéité que nous observons dans la morphologie et la migration n'est d'intérêt que si les traits propres à une cellule sont conservés dans le temps. Nous avons suivi l'évolution de la vitesse et de l'élongation des trajectoires en filmant les mêmes cellules pendant 36 heures. Pour chaque cellule, la vitesse, le paramètre A2 et le rayon de giration normalisé par la longueur totale de la trajectoire (Rg^2/l_i) ont été calculés pour les 12 premières et les 12 dernières heures (Figure 43). Le Rg^2/l_i correspond à l'étalement des pas d'une trajectoire depuis son origine. Un petit rayon correspond à une trajectoire plus ou moins statique, alors qu'un grand rayon correspond à celle d'une cellule s'éloignant de son origine. Dans la Figure 43, nous observons les nuages de points ainsi que les régressions linéaires correspondant à ceux-ci. Les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés pour chacun des paramètres. Compte tenu des faibles coefficients de corrélation obtenus, nous avons procédé à un test de permutations, où les valeurs des 12 premières heures ont été réarrangées aléatoirement. Nous avons ainsi déterminé que la vitesse et le rayon de giration du temps 0 étaient positivement corrélés au temps 1. Pour le paramètre A2, le test était non significatif.

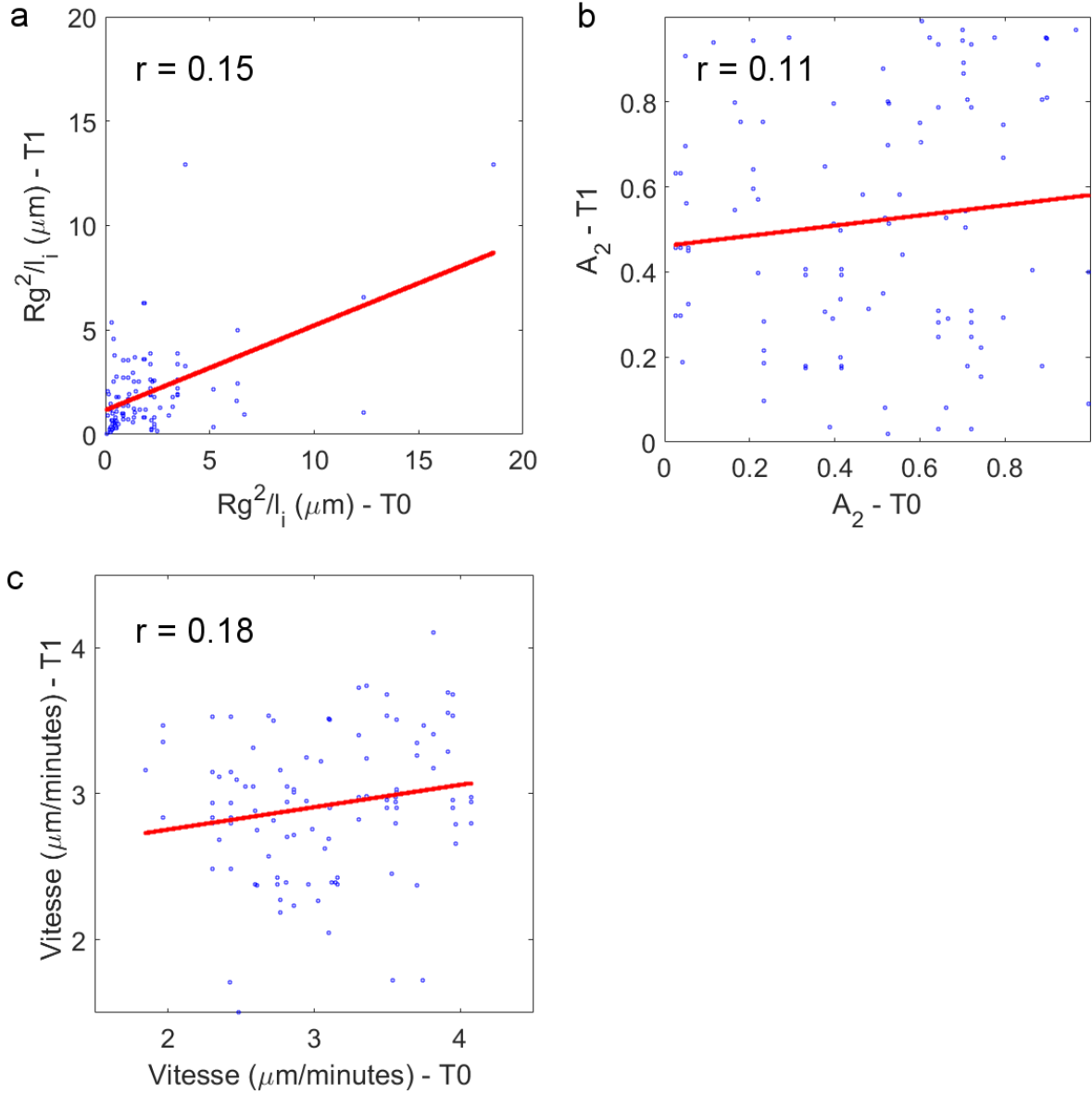


Figure 43. **Conservation des phénotypes dans le temps**

Corrélation phénotypique des paramètres de mêmes neutrophiles, entre le jour 0 (T0) et le jour 1 (T1). **(a et b)** Élongation des trajectoires évalué par **(a)**, le rayon de giration normalisé par la longueur de la trajectoire, $Rg^2/l_i (\mu m)$ ou **(b)**, le paramètre A_2 . **(c)** Vitesse des trajectoires ($\mu m/minutes$). Les données brutes sont en bleu alors que la régression linéaire est en rouge. Les coefficients de corrélation de Pearson (r) ont été évalué avec un test de permutation. À gauche, données originales. À droite, données randomisées.

Enrichissement des phénotypes.

Comme les phénotypes migratoires sont conservés dans le temps, nous avons cherché à isoler des cellules d'intérêt et à les suivre dans le temps. Nous avons voulu enrichir la fraction des cellules qui sont rapides et/ou dont les trajectoires sont allongées, tel que décrit par le rayon de giration (Figure 44). La Figure 44 ne présente qu'une preuve de concept de l'expérience désirée puisque, comme il sera décrit subséquemment, l'efficacité du protocole est présentement très faible. Ainsi donc, dans cette preuve de concept, alors que nous avons marqué au CLaP 15 cellules, seulement 2 cellules ont pu être isolées et réobservées 5 jours plus tard. Dans l'essai original, c'est-à-dire au premier jour, une des deux cellules marquées était plus rapide que la moyenne, alors que l'autre présentait une trajectoire plus allongée que la moyenne. Au cinquième jour, ces 2 cellules sont devenues 6 cellules filles. Celles-ci étaient toutes plus rapides que la moyenne des cellules de l'essai original et le rayon de giration était plus élevé dans 5 des 6 cas. Toutefois, il est à noter que le contrôle idéal, soit le marquage de cellules lentes et avec un faible rayon de giration, n'a pas fonctionné.

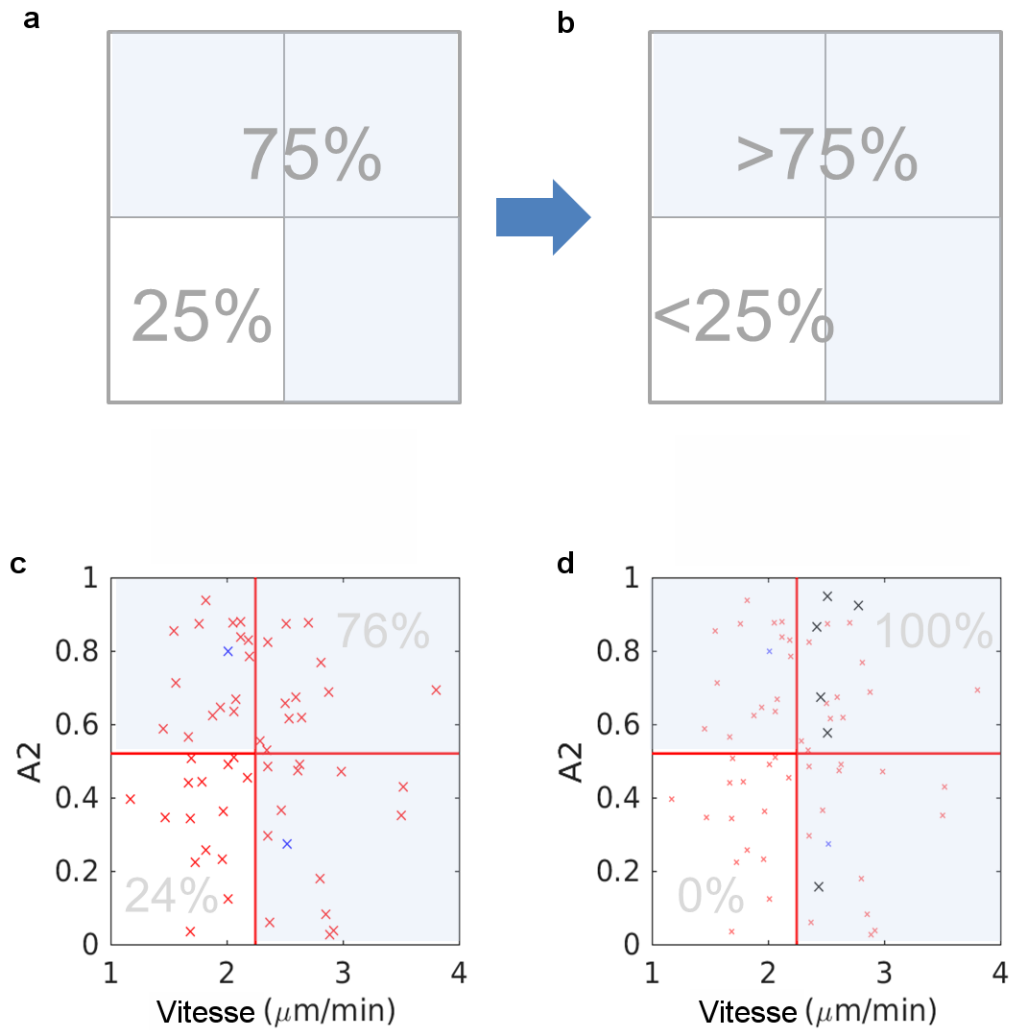


Figure 44. **Enrichissement de phénotype**

Preuve de concept d'un enrichissement de phénotype lié à la migration. **(a et b)** Distribution et résultat attendu. **(c)** Distribution des phénotypes, au premier jour. Les lignes rouges délimitent les moyennes de vitesse et de rayon de giration. Chaque croix représente une cellule. *En rouge*, cellules non marquées par CLaP. *En bleu*, cellules marquées par CLaP. **(d)** Les croix noires montrent les phénotypes des cellules filles au cinquième jour, superposées sur les distributions originales.

Tri par dissociation

Dans l'article original présentant la méthode de CLaP (Binan, et al. 2016a), nous décrivons un phénomène par lequel les cellules marquées sont résistantes aux agents de dissociation, tels que la trypsine. En effet, différents liens chimiques sont créés, à la suite de

l'excitation du fluorophore par le laser, lors de la libération de radicaux libres. Il semble que certains de ces liens se trouvent entre la membrane de la cellule et le substrat de culture. La résistance aux agents de dissociation est partielle et relative, puisqu'en augmentant le temps d'incubation ou la force mécanique, nous arrivons à dissocier les cellules marquées. Nous pouvons donc trier les cellules d'intérêt en établissant les conditions de dissociation permettant de détacher uniquement les cellules inintéressantes. Toutefois, cette approche est surtout efficace lorsqu'on marque des régions entières d'une couche confluente de cellules (observation personnelle, communication personnelle, Loïc Binan). L'approche est beaucoup plus difficile à maîtriser et moins reproductible pour des cellules individuelles. De manière intrinsèque, l'attachement des cellules à un substrat et leur dissociation sont variables d'une région d'une chambre de culture à l'autre. La Figure 45 (a et b) montre qu'environ 50 % des cellules originales se sont décollées lors d'un rinçage au PBS, avant même l'incubation à la trypsine-EDTA. En général, les cellules sont plus résistantes à la dissociation en périphérie des chambres. Nous observons la même tendance lorsque les chambres, de taille similaire, sont rondes. La Figure 45 (c et d) montre un exemple où la dissociation sélective a permis de conserver 100 % des cellules marquées qui ont préalablement résisté au rinçage (6 sur 6). Seulement 4 cellules non marquées contaminent cette région de la chambre, alors qu'un total de 93 cellules ont résisté à un premier lavage au PBS (4% de contamination) (Figure 45c). Le marquage n'affecte pas la morphologie et la viabilité des cellules (Figure 45b et d). Des études de viabilité plus exhaustives ont déjà été effectuées par le passé (Binan, et al. 2016a) De manière anecdotique, certaines cellules incorporent le B4F sans avoir été illuminées par le laser (Figure 45b, flèche). Souvent, cette incorporation non spécifique survient chez des cellules mortes. Le Tableau VII compile l'efficacité du tri de quatre expériences indépendantes.

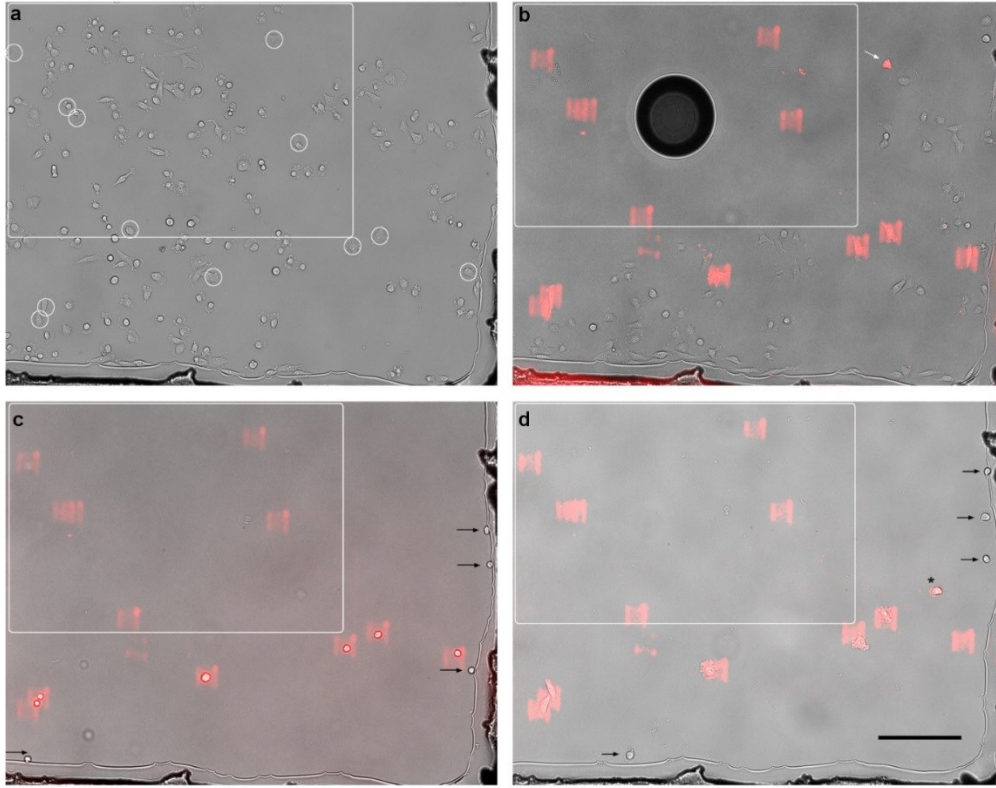


Figure 45. **Étapes clés du tri par dissociation**

(a, b, c et d) Même région d'intérêt photographiée à différentes étapes du protocole de tri. Cette région représente le coin inférieur bas, soit un quart de la chambre de culture. Le rectangle blanc indique la zone susceptible aux rinçages. (a) Culture cellulaire de basse densité. Les cellules sélectionnées pour le marquage au CLaP sont encadrées en blanc. (b) Après le marquage au CLaP et un lavage au PBS. Image composée. *En rouge*, streptavidine-Cy5. La flèche blanche pointe une cellule fluorescente qui n'était pas la cible d'un marquage. (c) Après incubation avec la trypsine-EDTA. Les flèches noires pointent des cellules non marquées qui sont restées attachées au substrat. (d) Après une journée en culture suivant le marquage au CLaP. L'astérisque montre une cellule marquée qui s'est éloignée de la zone balayée par le laser. Échelle de 200 μm .

Tri magnétique

Compte tenu des faibles taux d'efficacité et de reproductibilité du tri par dissociation, nous avons développé un protocole de tri par billes magnétiques (Figure 46). Dans ce cas, les cellules marquées sont incubées avec des billes dont la surface est fonctionnalisée par de la streptavidine. Ces billes s'attachent aux cellules de manière plus ou moins spécifique (Figure 46b). Dans cette figure, on peut voir qu'alors que les cellules marquées sont entourées de plusieurs billes, les cellules non marquées en possèdent tout de même quelques-unes. Deux facteurs critiques influencent la liaison des billes. Premièrement, si les cellules sont incubées

trop longtemps avec de la biotine, elles tendent à l'incorporer à leur surface de manière non spécifique. Celles-ci seront donc susceptibles à l'attachement des billes couvertes de streptavidine. À l'inverse, s'il reste de la biotine en solution dans le milieu lors de l'incubation des billes, celle-ci occupe les sites de liaison de la streptavidine sur les billes, empêchant leur liaison aux cellules. En plus des problèmes de liaison des billes, les cellules extraites par les aimants ne résistent pas toujours au protocole de tri. En effet, la Figure 46d montre les cellules triées après deux jours en culture. Des quatre cellules marquées au CLaP, seulement deux ont retrouvé une morphologie normale. De la même manière, certaines cellules contaminantes semblent mortes. Selon le protocole actuel, l'efficacité du tri magnétique n'est pas meilleure que le tri par dissociation (Tableau VII).

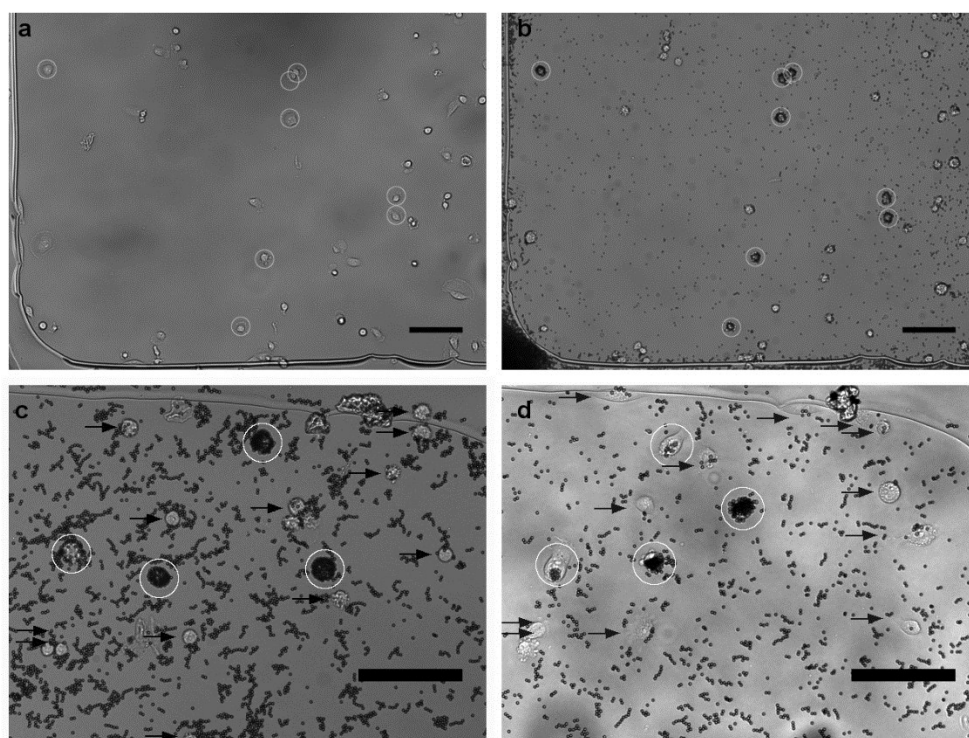


Figure 46. **Étapes clés du tri magnétique**

(a et b) Même région d'intérêt photographiée avant et après l'ajout de billes magnétiques. **(a)** Culture cellulaire de basse densité. Les cellules sélectionnées pour le marquage au CLaP sont encerclées en blanc. **(b)** Après le marquage au CLaP et incubation avec les billes magnétiques. **(c et d)** Même région d'intérêt du pétri collecteur. **(c)** Immédiatement après le tri. Les flèches noires pointent des cellules non marquées qui ont été triées non spécifiquement. **(d)** Après deux journées en culture. Échelle de 100 μm

Tableau VII. Comparaison de l'efficacité du CLaP

Compilation de l'efficacité du CLaP	Moyenne (\pm écart-type)
Densité cellulaire avant CLaP	206 cellules/mm ² (\pm 14)
Cellules fonctionnalisées	5.6 cellules/mm ² (\pm 2.9)
Perte cellulaire lors des rinçages	41.6 % (\pm 5.8)
Succès - tri par dissociation	49.0 % (\pm 40.9)
Ratio de contaminants – tri par dissociation	5.5 (\pm 6.2)
Succès - tri magnétique	36.3 % (\pm 43.9)
Ratio de contaminants – tri magnétique	1.9 (\pm 1.7)

4 expériences indépendantes.

Discussion

En développant notre protocole d'enrichissement cellulaire, nous avons établi l'hétérogénéité basale des MDA-MB-231. Kim et al. (2013) présentent eux aussi un essai de migration des MDA-MB-231 dynamique dans le temps. Leurs systèmes de microfluidiques et d'imagerie permettent de suivre la morphologie des cellules et de caractériser les trajectoires de cellules migrant dans un gel de collagène. Dans notre essai en 2D, les cellules sont beaucoup plus rapides et plus polarisées. Cette constatation nous rappelle que le mouvement des cellules en deux dimensions est nécessairement de type mésenchymal, dépendant des intégrines alors que le mouvement dans une matrice peut aussi être amœboïdes, lorsque les cellules se poussent à travers les pores de la matrice. Il importera donc, une fois le protocole établi, de vérifier la corrélation entre les caractéristiques d'une population enrichie en 2D et ses phénotypes en 3D. Wang et al. (2004), pour leur part, ont développé un système de microfluidique en 2D où la concentration et la forme du gradient de facteur de croissance épidermale EGF étaient rigoureusement contrôlés. Les MDA-MB-231 répondaient différemment en fonction de pente du gradient ainsi qu'en fonction de la variation de concentration en EGF. Le LAPAP, tel que décrit précédemment dans cette thèse, pourrait servir à caractériser avec encore plus de détail l'effet de la géométrie du gradient sur la chimiotaxie des cellules cancéreuses.

Par notre approche, nous avons démontré que les phénotypes migratoires de cellules individuelles sont conservés dans le temps. Ceci corrobore les observations publiées

précédemment (Chen, et al. 2015). En effet, ce groupe a développé un système de capture de cellules hautement chimiotactique migrant dans des serpentins. Ces cellules récupérées avaient, après propagation, un rayon de colonie plus grand, une excentricité plus élevée et migraient plus loin que des cellules servant de contrôles. Les chercheurs ont aussi déterminé que ces cellules exprimaient plus la GTPase RhoC et p38 γ . Ces gènes ont été associés à la motilité des cellules cancéreuses. Il serait intéressant de tester l'expression de ces gènes chez les populations que nous enrichissons.

Les coefficients de corrélations que nous avons obtenues sont faibles. Nous pensons que ceci est dû au fait qu'à travers le cycle cellulaire, les phénotypes sont changeant. Il est difficile de corrélérer à quel moment du cycle cellulaire correspondent les données du temps 0 et du temps 1. De plus, certaines des données du temps 1 proviennent des cellules filles des cellules du temps 0. Il est possible que les phénotypes varient en fonction de l'âge de la cellule. Considérant tous ces facteurs de variabilité, il est normal que les coefficients soient faibles.

L'efficacité du protocole d'enrichissement et celle des protocoles de tri sont faibles et nécessitent encore des optimisations. Nous estimons que les difficultés résident entre autres dans la longue durée de l'expérience entière ainsi que dans la maîtrise de quelques étapes clés. Dans le futur, nous travaillerons à caractériser les forces d'adhérence des cellules à différents substrats. Nous désirons ainsi diminuer les pertes cellulaires lors des lavages ainsi qu'uniformiser les différentes régions d'une même chambre de culture. Nous croyons que le tri par dissociation a plus de potentiel que le tri magnétique, car il impose un moins grand stress mécanique aux cellules tout en permettant à celles-ci de rester sur le même substrat de culture. Ce substrat, ayant été préalablement colonisé, est probablement déjà couvert de molécules favorisant la croissance.

Finalement, en perspective, nous pourrions adapter le CLaP à d'autres essais de migration. En effet, comme il est plus facile de marquer des zones de cellules que des cellules individuelles, nous avons déjà tenté avec succès de marquer le front de migration lors d'un essai d'invasion en 2D (données personnelles). Nous pourrions, par exemple, donner suite à une analyse en temps réel de vélocimétrie (Weiger, et al. 2013), et marquer des zones migrant différemment des autres. Par la suite, en triant ces cellules, nous pourrions analyser par séquençage le profil d'expression des gènes qui caractérise ces cellules. Dans un même ordre d'idée, nous cherchons

aussi à développer un système de co-culture où des hépatocytes influenceront la migration et la transformation des MDA-MB-231. Nous comptons marquer les cellules qui répondent aux hépatocytes et les séquencer individuellement.

Discussion générale

Dans cette thèse, j'ai présenté trois projets liant la migration cellulaire, la fonctionnalisation de substrat, les essais de migration et l'analyse d'image. Pour chacun de ces aspects, j'ai cherché à pousser les frontières des connaissances un peu plus loin. Dans cette discussion, je présente un résumé de mes contributions, les mets en contexte dans leurs domaines respectifs et donne ma perspective sur les principaux défis rencontrés et sur les opportunités futures.

Dans la première section, j'ai développé un essai de migration sur un substrat modifié grâce auquel j'ai démontré la possibilité d'adapter un essai classique afin de lui conférer de nouvelles fonctionnalités. J'ai montré le potentiel de la technologie du LAPAP appliquée spécifiquement à l'haptotaxie, et ce, grâce à la fabrication de gradients continus, ayant des formes précises et définies par l'utilisateur. Mes expériences confirment que les neutrophiles répondent aux peptides formylés liés de manière covalente à un substrat. Finalement, j'ai aussi mis en valeur un système d'imagerie approprié, permettant d'analyser les trajectoires d'un grand nombre de neutrophiles. J'ai proposé de nouveaux paramètres décrivant la forme des trajectoires dans le temps et quantifiant la pénétration des neutrophiles dans l'espace de confinement.

Dans la deuxième section, j'ai appliqué le système d'imagerie développé précédemment dans le but d'établir les phénotypes migratoires de deux sous-populations de neutrophiles. J'ai démontré que les neutrophiles de basse densité répondaient aux signaux chimiotactiques sécrétés par les cellules cancéreuses isolées de métastases du foie. J'ai aussi établi qu'en inhibant le récepteur de C3a, cette sous-population ne répond plus aux signaux des métastases du foie.

Finalement, dans la troisième partie, j'ai adapté la fabrication de gradients peptidiques à la fonctionnalisation de membranes cellulaires. De cette manière, j'ai pu marquer spécifiquement des cellules cancéreuses dont le phénotype migratoire les différenciait du reste d'une population. Ce faisant, j'ai décrit la variabilité intrinsèque des paramètres de migration chez une population

de cellules cancéreuses. Par une analyse de corrélation, j'ai aussi montré la conservation de cette variabilité dans le temps. En dernier lieu, j'ai établi l'efficacité des protocoles de tri enrichissant un échantillon en cellules marquées.

Ces trois projets mettent en valeur la grande plasticité dans les modes de locomotion d'une même population ou d'un même type cellulaire. Les signaux perçus par les cellules sont multiples, tant par la variété de molécules sécrétées par l'environnement que par la diversité des matrices dans lesquelles les cellules évoluent. Ces signaux sont intégrés par les cellules et en dictent les fonctions. Les voies de signalisations engagées influencent la morphologie des cellules, l'adhérence aux substrats, la polarisation de récepteurs à la membrane et la polarisation dans la production des microfilaments du cytosquelette (von Philipsborn and Bastmeyer 2007). Ces réponses varient d'une cellule à l'autre, tant dans le cas des neutrophiles qui présentent des phénotypes pro et antiinflammatoires que dans le cas des cellules cancéreuses qui présentent une grande diversité clonale.

Lors d'un dommage ou d'inflammation aiguë dans les tissus, les neutrophiles s'activent et s'engagent dans une séquence d'évènements. Originellement circulant dans les vaisseaux, elles s'accrochent ensuite aux parois, traversent la couche endothéliale et pénètrent enfin le stroma, au niveau du lieu de l'inflammation. Les molécules chimiotactiques sont sécrétées soit par les cellules résidentes du stroma soit par des agents infectieux exogènes. Les signaux sont des chimiokines, des lipides ou des peptides qui diffusent ou s'attachent aux différents substrats rencontrés. L'haptotaxie représente un mode particulier de chimiotaxie favorisé lorsque les cellules sont exposées à des signaux liés à un substrat. La biomécanique et les voies de signalisation impliquées dans ce type de migration lui sont spécifiques. Par exemple, dans le cas des cellules dendritiques, la modulation du récepteur GRK6 impacte l'orientation des cellules lorsqu'elles migrent sur un gradient de CCL21 immobilisé, mais pas lorsque la molécule leur est présentée sous forme soluble (Schwarz, et al. 2017).

Dans le cas du cancer, représentant cette fois un lieu d'inflammation chronique, cette plasticité cellulaire s'exprime pour différentes composantes de l'environnement tumoral. Dans les cas qui nous intéressent, notons que la présence d'une tumeur maligne d'un cancer du sein est corrélée avec une augmentation du taux de neutrophiles de basse densité par rapport aux neutrophiles de haute densité (Sagiv, et al. 2015). Ces deux sous-populations de neutrophiles ont des fonctions

spécifiques et souvent même opposées. Entre autres, elles répondent différemment aux signaux sécrétés par divers organes et par les niches pré-métastatiques (Granot, et al. 2011; Mishalian, et al. 2017; Sagiv, et al. 2015). De manière similaire, les cellules tumorales elles-mêmes sont influencées par les signaux les entourant. Selon les signaux présents et leur potentiel génétique propre, certaines des cellules de la tumeur primaire s'échappent pour former des métastases dans des organes distants. Ce processus métastatique implique un changement de morphologie favorisant la migration cellulaire à travers le stroma, l'intravasation dans les vaisseaux, l'extravasation, l'invasion du stroma de l'organe distant et finalement une transformation morphologique inverse promouvant l'implantation et la prolifération.

Les essais de chambre sous agarose et de migration spontanée présentés dans cette thèse mettent en lumière la plasticité dans la migration. Dans les deux cas, les systèmes permettent avantageusement une observation visuelle de la migration ainsi qu'un suivi dynamique dans le temps. Comme mentionné précédemment, il n'est pas toujours possible de corréler la réponse à des essais statiques à la réponse à des essais dynamiques (Weiger, et al. 2013). Les chambres de migration sous agaroses sont standardisées et le protocole d'utilisation a été éprouvé par plusieurs laboratoires (Heit and Kubes 2003). Celles-ci sont facilement réalisables puisqu'elles ne nécessitent pas d'équipements ou de connaissances particulières. Toutefois, le succès de la préparation de chambre dépend de plusieurs facteurs, dont le type d'agarose, le pH final, la force du poinçon, l'aiguisage du poinçon, ou encore la succion imposée lors du retrait du morceau d'agarose. Ainsi, la variabilité observée dans ce type d'expérience est grande et réduit donc la puissance de l'essai. Compte tenu de l'essor et la démocratisation de la microfabrication des dernières années, si je devais recommencer mon doctorat au jour d'aujourd'hui, je favoriserais une chambre de confinement ou un système microfluidique simple. Par exemple, deux groupes ont proposé une chambre de confinement pour la migration des leucocytes peu adhérents (Le Berre, et al. 2014; Schwarz and Sixt 2016). La microfabrication étant de plus en plus utilisée, plusieurs universités ont maintenant accès à une plateforme de production de plaques de silicium. À Montréal seulement, de tels services sont offerts par la Polytechnique/Université de Montréal, l'Université McGill et l'Université Concordia. Autrement, des compagnies comme Ibidi® ou Ananda™ proposent aussi des microchambres de culture ou des systèmes de microfluidiques ne nécessitant pas de pompes externes pour le maintien d'un gradient. Ces

systèmes constituent un compromis intéressant de technologies abordables, reproductibles et facilement mises en place dans un laboratoire.

La fonctionnalisation de substrats a été régulièrement appliquée à l'étude de la migration cellulaire (Ruprecht, et al. 2017). Par exemple, rappelons qu'en plus de mes travaux, le LAPAP a servi à évaluer la migration des cellules neuronales sur des gradients de laminine (Belisle, et al. 2012), et la migration des cellules dendritiques sur des gradients de CCL21 (Schwarz and Sixt 2016; Schwarz, et al. 2017). Toutefois, malgré nos efforts pour rendre la technique accessible (Belisle, et al. 2014), comme le LAPAP nécessite une maîtrise de base des montages optiques et des notions de programmation, il n'est pas à la portée des laboratoires typiques de biologie cellulaire. Je crois que, compte tenu de sa relative complexité, lorsqu'appliquée à la migration cellulaire, cette technique trouve sa place dans les laboratoires étudiant spécifiquement l'haptotaxie ou l'impact de la géométrie d'un gradient particulier. Par rapport à l'impression par microcontact, le LAPAP offre plus de flexibilité quant à la géométrie des gradients formés. De plus, lorsque le design de la molécule à attacher est maîtrisé, le LAPAP offre aussi plus de contrôle sur la présentation de la molécule liée à son ligand que le microcontact. Toutefois, le lien créé entre le substrat et la molécule d'intérêt par le LAPAP n'est pas nécessairement représentatif du type de lien retrouvé *in vivo*. En effet, la covalence d'un lien peut influencer l'interaction de la molécule avec son récepteur, tel que présenté par Riahi *et al.* (2017). Dans un tout autre ordre d'idées, au-delà de la recherche fondamentale portant sur l'haptotaxie, le LAPAP pourrait facilement s'intégrer à une technologie portable diagnostiquant des pathologies reliées à la chimiotaxie (Sackmann, et al. 2014; Sackmann, et al. 2012).

Cette thèse présente des applications de la fonctionnalisation de surface de culture ainsi que de membranes cellulaires. À la frontière entre ces deux types de substrats se trouvent les vésicules extracellulaires (Gyorgy, et al. 2011). Les microvésicules, les exosomes, les corps apoptotiques et les autres membranes vésiculaires libérées par les cellules servent entre autres de mode de communication. On sait, par exemple, que les neutrophiles sécrètent des vésicules contenant le LTB₄, lorsqu'en présence de fMLF (Majumdar, et al. 2016). On sait aussi que les neutrophiles laissent des traces vésiculaires enrichies de CXCL12, qui provoqueraient l'haptotaxie des CD8, lors d'infections virales (Lim, et al. 2015). De la même manière, les cellules cancéreuses et immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral s'échangent des protéines et des

ARNs par les vésicules extracellulaires, contribuant au phénotype métastatique (Green, et al. 2015; Lowry, et al. 2015; Oudin and Weaver 2016). Ces vésicules, plus imposantes que des molécules solubles, pourraient servir d'ancrage des signaux à la matrice extracellulaire. Ces exemples démontrent la pertinence d'exploiter le LAPAP et le CLaP à la fonctionnalisation des vésicules membranaires, sur une surface de culture, sous forme de gradient de concentration. Par exemple, plutôt que d'utiliser de laborieux systèmes de co-culture, il serait possible d'isoler les vésicules extracellulaires provenant d'une tumeur ou d'un organe, de les biotinyler et de les déposer sur un gradient de biotine/streptavidine créé par le LAPAP. Les cellules immunitaires ou cancéreuses pourraient alors être exposées à ce gradient, servant d'essai de migration. De plus, ce système permettrait d'évaluer certains phénotypes comme la transformation de cellules épithéliales à cellules mésenchymateuses et vice-versa.

En plus de la fonctionnalisation de vésicules extracellulaires, j'imagine aussi une autre expérience mettant en valeur tant la fonctionnalisation de substrats de culture que de membranes cellulaires. Je crois qu'il serait pertinent de développer un système tissulaire de cellules fonctionnalisées cultivées sur une matrice modifiée par le LAPAP. Un peu à la manière des poumons-sur-chip (Benam, et al. 2016), un tel système pourrait être composé d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales seraient modifiées par CLaP pour présenter un signal chimiotactique intermédiaire comme le CXCL8 alors que la matrice serait fonctionnalisée avec des signaux cibles comme le fMLF. Ce système servirait alors d'essai de migration pour des neutrophiles. Il faciliterait l'étude de la priorisation de gradients en présence de multiples signaux ou encore l'étude de la biomécanique de l'extravasation. L'élégance de ce système démontrerait la puissance des technologies présentées dans cette thèse.

Conclusion

J'aimerais terminer cette thèse en sortant légèrement de ma zone de confort, reprenant les concepts émis par Thomas Kuhn sur les paradigmes en science et par Roger Everett sur la diffusion des innovations. Thomas Kuhn, physicien, philosophe et historien des sciences, dans « The Structure of Scientific Revolutions » en 1962, a introduit le concept de paradigme en science (Kuhn 2008; Marcum and Marcum 2015). Il précise que la science se polarise entre la

tradition et l'innovation. Dans une discipline donnée, un paradigme est constitué de l'ensemble des connaissances admises par les spécialistes. Avec le temps, l'état du savoir se raffine jusqu'à ce que survienne une série de découvertes incohérentes avec le paradigme. Cet état de crise pousse les spécialistes à revisiter le paradigme pour l'étendre ou le remplacer. Kuhn cite l'importance, dans ce cycle, des jeunes chercheurs portant un regard frais sur leur discipline. Il mentionne aussi le rôle des disciplines connexes dans les innovations. Petter, parlant de Kuhn, (Petter 2015), donne l'exemple d'un des paradigmes centraux de la biologie, la génétique mendélienne. Les étapes clés dans la progression de cette discipline sont liées à l'assimilation de sciences connexes telles la cytologie, l'écologie, la physiologie ou encore la biochimie. C'est d'ailleurs deux jeunes chercheurs, Watson, 26 ans, et Crick, 37 ans, tous les deux formés en physique qui découvrirent la structure de l'ADN.

C'est ce concept d'interdisciplinarité dans l'avènement des innovations qui m'inspire dans la théorie de Thomas Kuhn. Ces dernières années, dans le cadre de cette thèse, j'ai travaillé principalement avec des physiciens et des ingénieurs. Ce fut tant une leçon d'humilité pour moi qu'une opportunité extraordinaire. Je crois sincèrement que le LAPAP et le CLaP, développés par des physiciens, ont le potentiel de faire bouger les frontières du savoir en biologie et pourtant, les principes sur lesquels ces deux technologies reposent sont assez simples. De la même manière, je crois que l'algorithmie, par le traitement d'images objectif et quantitatif, apporte un regard neuf sur les jeux de données générées par la microscopie. Ma thèse, alliant technologie et traitement d'image pour l'étude de la biologie cellulaire classique, n'est qu'un minuscule exemple de résultats obtenus par l'interdisciplinarité.

Comme mentionné dans la revue de littérature, Roger Everett, lui aussi en 1962, a pour sa part établi les bases de la théorie de la diffusion des innovations. Son livre, « Diffusion of Innovations », réédité plusieurs fois, stipule qu'une innovation n'est adoptée que graduellement par les gens avant de devenir la norme au sein d'une communauté. Ainsi, Rogers cite l'exemple de l'adoption d'un nouveau médicament ou encore la mise en place à grande échelle de technologies, comme la tomographie axiale. Le succès de l'adoption d'une technologie, tant par une niche restreinte que par un public plus large, dépend de certains éléments comme le potentiel d'innovation de la technologie, les canaux de communication, le temps et le système social dans lequel la technologie est mise en place.

Il est intéressant de faire le parallèle entre cette théorie et certaines des innovations technologiques discutées dans cette thèse. Ainsi, Whiteside, (2006) commentait dans un éditorial les origines et le futur de la microfluidique. Il écrivait que le potentiel d'innovation de la microfluidique était énorme, mais que malgré tout, au-delà des démonstrations de principe, la technologie était lente à terminer son cycle de développement. Plus de dix ans plus tard, des progrès réels ont été réalisés, incluant, par exemple, la commercialisation de plateformes de tri cellulaire telles que Fluidigm® ou de séquençage de nouvelle génération telles que Illumina®, mais toutefois, la technologie n'a certainement pas encore livré tout son potentiel (Chiu, et al. 2017). Ces opportunités et ces préoccupations s'extrapolent aux domaines de la microfabrication et des technologies dites « Lab-on-a-Chip » en général, comme il est mentionné dans l'article présenté dans l'annexe 1. À l'inverse de ces technologies émergentes, l'essai sous agarose et la chambre de Boyden sont deux exemples de technologies bien établies malgré certaines de leurs limitations. Comment faire pour permettre la diffusion de nouvelles technologies dans la communauté scientifique travaillant sur la migration cellulaire? J'ose imaginer que la clé réside encore une fois dans la communication entre les différentes disciplines scientifiques.

Bibliographie

Adams, D. N., et al.

2005 Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *J Neurobiol* 62(1):134-47.

Akita, H., et al.

2010 Particle Tracking of Intracellular Trafficking of Octaarginine-modified Liposomes: A Comparative Study With Adenovirus. *Molecular Therapy* 18(5):955-964.

Ambravaneswaran, V., et al.

2010 Directional decisions during neutrophil chemotaxis inside bifurcating channels. *Integr Biol (Camb)* 2(11-12):639-47.

Ananthakrishnan, R., and A. Ehrlicher

2007 The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci* 3(5):303-17.

Artemenko, Y., T. J. Lampert, and P. N. Devreotes

2014 Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes. *Cell Mol Life Sci* 71(19):3711-47.

Arthur, David, and Sergei Vassilvitskii

2007 k-means++: the advantages of careful seeding. *In Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithms*. Pp. 1027-1035. New Orleans, Louisiana: Society for Industrial and Applied Mathematics.

Azioune, A., et al.

2009 Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab Chip* 9(11):1640-2.

Baker, B. M., and C. S. Chen

2012 Deconstructing the third dimension - how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 125(Pt 13):3015-24.

Barallobre, M. J., et al.

2000 Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development* 127(22):4797-810.

Bastian, P., et al.

- 2005 Myosin regulation in the migration of tumor cells and leukocytes within a three-dimensional collagen matrix. *Cell Mol Life Sci* 62(1):65-76.
- Belisle, J. M., et al.
- 2008a Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP. *Lab on a Chip* 8(12):2164-7.
-
- 2008b Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP. *Lab Chip* 8(12):2164-7.
- Belisle, J. M., D. Kunik, and S. Costantino
- 2009 Rapid multicomponent optical protein patterning. *Lab Chip* 9(24):3580-5.
- Belisle, J. M., L. A. Levin, and S. Costantino
- 2012 High-content neurite development study using optically patterned substrates. *PLoS One* 7(4):e35911.
- Belisle, J. M., J. Mazzaferri, and S. Costantino
- 2014 Laser-assisted adsorption by photobleaching. *Methods Cell Biol* 119:125-40.
- Benam, K. H., et al.
- 2016 Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nat Methods* 13(2):151-7.
- Bentley, D., and A. Toroian-Raymond
- 1986 Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature* 323(6090):712-5.
- Bergert, M., et al.
- 2015 Force transmission during adhesion-independent migration. *Nat Cell Biol* 17(4):524-9.
- Berx, G., and F. Van Roy
- 2001 The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3(5):289-93.
- Beutler, Ernest, and William J. Williams
- 2001 Williams hematology. New York
- Toronto: New York
- Toronto : McGraw-Hill, Medical Publishing Division.

Bevington, Philip R.

1992 Data Reduction And Error Analysis For The Physical Sciences: McGraw-Hill Companies.

Bhattacharjee, N., et al.

2010a A neuron-benign microfluidic gradient generator for studying the response of mammalian neurons towards axon guidance factors. *Integr Biol (Camb)* 2(11-12):669-79.

Bhattacharjee, N., et al.

2010b A neuron-benign microfluidic gradient generator for studying the response of mammalian neurons towards axon guidance factors. *Integrative Biology* 2(11-12):669-679.

Bhowmick, N. A., et al.

2001 Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12(1):27-36.

Billadeau, D. D.

2008 PTEN gives neutrophils direction. *Nat Immunol* 9(7):716-8.

Binan, L., et al.

2016a Live single-cell laser tag. *Nat Commun* 7:11636.

Binan, Loïc, et al.

2016b Cell Labeling via Photobleaching.

Blawas, A. S., and W. M. Reichert

1998 Protein patterning. *Biomaterials* 19(7-9):595-609.

Boussommier-Calleja, A., et al.

2016 Microfluidics: A new tool for modeling cancer-immune interactions. *Trends Cancer* 2(1):6-19.

Boyden, S.

1962 The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115:453-66.

Boyum, A.

1968 Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:77-89.

Bradley, Derek, and Gerhard Roth

2007 Adaptive Thresholding using the Integral Image. *Journal of Graphics Tools* 12(2):13-21.

Brandau, S., K. Moses, and S. Lang

2013 The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer: cousins, siblings or twins? *Semin Cancer Biol* 23(3):171-82.

Branham, M. L., et al.

2002 Rapid prototyping of micropatterned substrates using conventional laser printers. *Journal of Materials Research* 17(7):1559-1562.

Breitbach, C. J., et al.

2007 Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 15(9):1686-93.

Bricard, A., et al.

2013 Emergence of macroscopic directed motion in populations of motile colloids. *Nature* 503(7474):95-98.

Campenot, R. B.

1977 Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(10):4516-9.

Cano, P. M., A. Vargas, and J. P. Lavoie

2016 A real-time assay for neutrophil chemotaxis. *Biotechniques* 60(5):245-51.

Carmona, G., et al.

2016 Lamellipodin promotes invasive 3D cancer cell migration via regulated interactions with Ena/VASP and SCAR/WAVE. *Oncogene* 35(39):5155-69.

Carter, S. B.

1965 Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature* 208(5016):1183-7.

—

1967 Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature* 213(5073):256-60.

Cavaillon, J. M.

2011 The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol* 90(3):413-24.

Celler, K., G. P. van Wezel, and J. Willemse

2013 Single particle tracking of dynamically localizing TatA complexes in *Streptomyces coelicolor*. *Biochem Biophys Res Commun* 438(1):38-42.

Chan, T. F., and L. A. Vese

2001 Active contours without edges. *IEEE Trans Image Process* 10(2):266-77.

Chen, C. S., et al.

1997 Geometric control of cell life and death. *Science* 276(5317):1425-8.

Chen, Y. C., et al.

2015 Single-cell Migration Chip for Chemotaxis-based Microfluidic Selection of Heterogeneous Cell Populations. *Sci Rep* 5:9980.

Chen, Y., et al.

2014 Rare cell isolation and analysis in microfluidics. *Lab Chip* 14(4):626-45.

Chenouard, N., I. Bloch, and J. C. Olivo-Marin

2013 Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 35(11):2736-3750.

Chenouard, Nicolas, et al.

2014 Objective comparison of particle tracking methods. *Nat Meth* 11(3):281-289.

Chien, C. B., et al.

1993 Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain. *Neuron* 11(2):237-51.

Chiu, Daniel T., et al.

2017 Small but Perfectly Formed? Successes, Challenges, and Opportunities for Microfluidics in the Chemical and Biological Sciences. *Chem* 2(2):201-223.

Chung, L., et al.

2014 Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer. *Breast Cancer Res* 16(3):R63.

Chung, S., et al.

- 2009 Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab Chip* 9(2):269-75.
- Clark, A. G., and D. M. Vignjevic
- 2015 Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* 36:13-22.
- Coffelt, S. B., M. D. Wellenstein, and K. E. de Visser
- 2016 Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer* 16(7):431-46.
- Collins, S. R., et al.
- 2015 Using light to shape chemical gradients for parallel and automated analysis of chemotaxis. *Mol Syst Biol* 11(4):804.
- Colom, B., et al.
- 2015 Leukotriene B4-Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo. *Immunity* 42(6):1075-86.
- Connelly, J C, et al.
- 1985 Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82(24):8737-8741.
- Cooley, James W., and John W. Tukey
- 1965 An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Mathematics of Computation* 19(90):297-301.
- Cooray, S. N., et al.
- 2013 Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(45):18232-7.
- Costantino, S., et al.
- 2005 Two-photon fluorescent microlithography for live-cell imaging. *Microscopy Research and Technique* 68(5):272-276.
- Coulthard, L. G., and T. M. Woodruff
- 2015 Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. *J Immunol* 194(8):3542-8.
- Crocker, John C., and David G. Grier

- 1996 Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science* 179(1):298-310.
- Cutler, J. E., and J. J. Munoz
- 1974 A simple in vitro method for studies on chemotaxis. *Proc Soc Exp Biol Med* 147(2):471-4.
- de Oliveira, S., et al.
- 2013 Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol* 190(8):4349-59.
- de Wit, J., and J. Verhaagen
- 2003 Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol* 71(2-3):249-67.
- Denny, M. F., et al.
- 2010 A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 184(6):3284-97.
- Dent, E. W., and F. B. Gertler
- 2003 Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40(2):209-27.
- Dertinger, S. K., et al.
- 2002 Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):12542-7.
- Dickson, B. J.
- 2001 Developmental neuroscience. Moving on. *Science* 291(5510):1910-1.
-
- 2002 Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298(5600):1959-64.
- Dodla, M. C., and R. V. Bellamkonda
- 2008 Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 29(1):33-46.
- Drasin, D. J., T. P. Robin, and H. L. Ford

- 2011 Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res* 13(6):226.
- Drescher, U., et al.
- 1995 In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82(3):359-70.
- Dumitru, C. A., S. Lang, and S. Brandau
- 2013 Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin Cancer Biol* 23(3):141-8.
- Dvorak, H. F.
- 1986 Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315(26):1650-9.
-
- 2015 Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* 3(1):1-11.
- Eddington, D. T., and D. J. Beebe
- 2004 Flow control with hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(2):199-210.
- Engler, A. J., et al.
- 2006 Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126(4):677-89.
- Ewing, James
- 1922 Neoplastic diseases; a treatise on tumors. Philadelphia: W. B. Saunders company.
- Falconnet, D., et al.
- 2006 Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* 27(16):3044-3063.
- Feng, X. Z., et al.
- 2004 Microcontact printing techniques in bioscience. *Chemical Research in Chinese Universities* 20(6):826-832.
- Filep, J. G.
- 2013 Biasing the lipoxin A4/formyl peptide receptor 2 pushes inflammatory resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(45):18033-4.
- Fourier, J.B.J.
- 1822 Théorie analytique de la chaleur: Chez Firmin Didot, père et fils.
- Foxman, E. F., J. J. Campbell, and E. C. Butcher

- 1997 Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 139(5):1349-60.
- Foxman, E. F., E. J. Kunkel, and E. C. Butcher
1999 Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol* 147(3):577-88.
- Fricke, R., et al.
2011 Axon guidance of rat cortical neurons by microcontact printed gradients. *Biomaterials* 32(8):2070-6.
- Fridlender, Z. G., et al.
2009 Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16(3):183-94.
- Friedl, P., and K. Wolf
2010 Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188(1):11-9.
- Galdiero, M. R., et al.
2013 Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218(11):1402-10.
- Gallo, G., and P. C. Letourneau
2004 Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* 58(1):92-102.
- Girrbach, M., et al.
2016 Leukocyte responses to immobilized patterns of CXCL8. *Colloids Surf B Biointerfaces* 142:385-91.
- Gollavelli, G., and Y. C. Ling
2012 Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe. *Biomaterials* 33(8):2532-45.
- Gonzalez, C. Rafael
c2008 Digital image processing.
- Granot, Z., et al.
2011 Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* 20(3):300-14.
- Green, T. M., et al.

- 2015 Breast Cancer-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Contribution to the Metastatic Phenotype. *Biomed Res Int* 2015:634865.
- Gross, P. G., et al.
- 2007 Applications of microfluidics for neuronal studies. *J Neurol Sci* 252(2):135-43.
- Guglietta, S., et al.
- 2016 Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nat Commun* 7:11037.
- Gundersen, R. W.
- 1985 Sensory neurite growth cone guidance by substrate adsorbed nerve growth factor. *J Neurosci Res* 13(1-2):199-212.
- Gundersen, R. W., and K. H. Park
- 1984 The effects of conditioned media on spinal neurites: substrate-associated changes in neurite direction and adherence. *Dev Biol* 104(1):18-27.
- Gupta, Lalit, Mohammad R. Sayeh, and Ravi Tammana
- 1990 A neural network approach to robust shape classification. *Pattern Recognition* 23(6):563-568.
- Gyorgy, B., et al.
- 2011 Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68(16):2667-88.
- Haessler, U., et al.
- 2009 An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies. *Biomedical Microdevices* 11(4):827-835.
- Halilovic, I., et al.
- 2015 Neutrophil migration under spatially-varying chemoattractant gradient profiles. *Biomed Microdevices* 17(3):9963.
- Hammarback, J. A., and P. C. Letourneau
- 1986 Neurite extension across regions of low cell-substratum adhesivity: implications for the guidepost hypothesis of axonal pathfinding. *Dev Biol* 117(2):655-62.
- Hammarback, J. A., et al.
- 1985 Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorbed laminin. *J Neurosci Res* 13(1-2):213-20.

- Hanahan, D., and R. A. Weinberg
2000 The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Harris, H.
1954 Role of chemotaxis in inflammation. *Physiol Rev* 34(3):529-62.
- Harvie, E. A., and A. Huttenlocher
2015 Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *J Leukoc Biol* 98(4):523-37.
- Hecht, I., et al.
2015 Tumor invasion optimization by mesenchymal-amoeboid heterogeneity. *Sci Rep* 5:10622.
- Heinz, W. F., M. Hoh, and J. H. Hoh
2011 Laser inactivation protein patterning of cell culture microenvironments. *Lab Chip* 11(19):3336-46.
- Heit, B., and P. Kubes
2003 Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. *Sci STKE* 2003(170):PL5.
- Heit, B., et al.
2008 PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol* 9(7):743-52.
- Henry, S. J., et al.
2015 Protrusive and Contractile Forces of Spreading Human Neutrophils. *Biophys J* 109(4):699-709.
- Herbert, C. B., et al.
1997 Micropatterning gradients and controlling surface densities of photoactivatable biomolecules on self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol) alkanethiolates. *Chemistry & Biology* 4(10):731-737.
- Herteman, N., A. Vargas, and J. P. Lavoie
2017 Characterization of Circulating Low-Density Neutrophils Intrinsic Properties in Healthy and Asthmatic Horses. *Sci Rep* 7(1):7743.
- Himanen, J. P., and D. B. Nikolov
2003 Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* 26(1):46-51.

- Hoffman, J. F., J. J. Linderman, and G. M. Omann
 1996 Receptor up-regulation, internalization, and interconverting receptor states. Critical components of a quantitative description of N-formyl peptide-receptor dynamics in the neutrophil. *J Biol Chem* 271(31):18394-404.
- Holden, M. A., and P. S. Cremer
 2003 Light activated patterning of dye-labeled molecules on surfaces. *J Am Chem Soc* 125(27):8074-5.
- Holmes, G. R., et al.
 2012 Drift-Diffusion Analysis of Neutrophil Migration during Inflammation Resolution in a Zebrafish Model. *Adv Hematol* 2012:792163.
- Hopker, V. H., et al.
 1999 Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401(6748):69-73.
- Horl, S., et al.
 2013 Reduction of complement factor H binding to CLL cells improves the induction of rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Leukemia* 27(11):2200-8.
- Horn-Ranney, E. L., et al.
 2012 Structural and molecular micropatterning of dual hydrogel constructs for neural growth models using photochemical strategies. *Biomedical Microdevices*.
- Hou, H. W., et al.
 2013 Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep* 3:1259.
- Huang, E. J., and L. F. Reichardt
 2001 Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang, Y., et al.
 2011 Evaluation of cancer stem cell migration using compartmentalizing microfluidic devices and live cell imaging. *J Vis Exp* (58):e3297.
- Huber, A. B., et al.
 2003 Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26:509-63.

Hummel, Robert

1977 Image enhancement by histogram transformation. *Computer Graphics and Image Processing* 6(2):184-195.

Hypolite, C. L., et al.

1997 Two-dimensional surface gradients of photoactivable R-phycoerythrin. *Protein Engineering* 10:84-84.

Ide, C., et al.

1983 Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* 288(1-2):61-75.

Jaqaman, K., et al.

2008a Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature Methods* 5(8):695-702.

—

2008b Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nat Methods* 5(8):695-702.

Jeon, N. L., et al.

2000 Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir* 16(22):8311-8316.

Joanne Wang, C., et al.

2008a A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues. *Lab on a Chip* 8(2):227-37.

—

2008b A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues. *Lab Chip* 8(2):227-37.

Johnson, A. R., et al.

1985 Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *Am Rev Respir Dis* 132(3):564-8.

Joyce, J. A., and J. W. Pollard

2009 Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9(4):239-52.

Justus, C. R., et al.

- 2014 In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp* (88).
- Kadota, M., et al.
- 2010 Delineating genetic alterations for tumor progression in the MCF10A series of breast cancer cell lines. *PLoS One* 5(2):e9201.
- Kaigala, G. V., et al.
- 2007 Rapid prototyping of microfluidic devices with a wax printer. *Lab Chip* 7(3):384-387.
- Kalaidzidis, Y.
- 2009 Multiple objects tracking in fluorescence microscopy. *Journal of Mathematical Biology* 58(1-2):57-80.
- Kam, L., et al.
- 2001 Axonal outgrowth of hippocampal neurons on micro-scale networks of polylysine-conjugated laminin. *Biomaterials* 22(10):1049-54.
- Kane, R. S., et al.
- 1999 Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 20(23-24):2363-76.
- Kaprielian, Z., R. Imondi, and E. Runko
- 2000 Axon guidance at the midline of the developing CNS. *Anat Rec* 261(5):176-97.
- Kaufmann, S. H.
- 2008 Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* 9(7):705-12.
- Keenan, T. M., and A. Folch
- 2008 Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip* 8(1):34-57.
- Keller, H. U., J. H. Wissler, and J. Ploem
- 1979 Chemotaxis is not a special case of haptotaxis. *Experientia* 35(12):1669-71.
- Keshishian, H., and D. Bentley
- 1983 Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshopper legs. I. The initial nerve pathway to the CNS. *Dev Biol* 96(1):89-102.
- Khaing, Z. Z., and C. E. Schmidt
- 2012 Advances in natural biomaterials for nerve tissue repair. *Neurosci Lett* 519(2):103-14.

Khreiss, T., et al.

2004 Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 110(17):2713-20.

Kidane, A. G., et al.

2009 A novel nanocomposite polymer for development of synthetic heart valve leaflets. *Acta Biomaterialia* 5(7):2409-2417.

Kim, B. J., et al.

2013 Cooperative roles of SDF-1alpha and EGF gradients on tumor cell migration revealed by a robust 3D microfluidic model. *PLoS One* 8(7):e68422.

Kim, H. J., et al.

2012 Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons. *Ann Biomed Eng* 40(6):1268-76.

Kim, I. S., and X. H. Zhang

2016 One microenvironment does not fit all: heterogeneity beyond cancer cells. *Cancer Metastasis Rev* 35(4):601-629.

Kim, S., H. J. Kim, and N. L. Jeon

2010 Biological applications of microfluidic gradient devices. *Integr Biol (Camb)* 2(11-12):584-603.

Kiryushko, D., V. Berezin, and E. Bock

2004 Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014:140-54.

Knoll, B., et al.

2006 Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci* 9(2):195-204.

Knoll, B., et al.

2007 Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nat Protoc* 2(5):1216-24.

Knoll, B., et al.

2001 A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 128(6):895-906.

Kolodkin, A. L., and D. D. Ginty

1997 Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron* 19(6):1159-62.

Kothapalli, C. R., et al.

2011a A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab Chip* 11(3):497-507.

—

2011b A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab on a Chip* 11(3):497-507.

Kotz, K. T., et al.

2010 Clinical microfluidics for neutrophil genomics and proteomics. *Nat Med* 16(9):1042-7.

Kreisel, D., et al.

2010 In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(42):18073-8.

Kroon, J., et al.

2014 Real-time imaging of endothelial cell-cell junctions during neutrophil transmigration under physiological flow. *J Vis Exp* (90):e51766.

Kuhn, T.

2008 *La structure des révolutions scientifiques*. L. Meyer, transl.

Kuijpers, T. W., et al.

1992 Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J Cell Biol* 117(3):565-72.

Kumar, A., and G. M. Whitesides

1993 Features of Gold Having Micrometer to Centimeter Dimensions Can Be Formed through a Combination of Stamping with an Elastomeric Stamp and an Alkanethiol Ink Followed by Chemical Etching. *Applied Physics Letters* 63(14):2002-2004.

LaFond, Richard

2012 *Cancer: The Outlaw Cell*: American Chemical Society.

Lai Wing Sun, K., J. P. Correia, and T. E. Kennedy

- 2011 Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138(11):2153-69.
- Lammermann, T., et al.
- 2013 Neutrophil swarms require LTB₄ and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* 498(7454):371-5.
- Lammermann, T., et al.
- 2008 Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453(7191):51-5.
- Landenberger, B., et al.
- 2012 Microfluidic sorting of arbitrary cells with dynamic optical tweezers. *Lab Chip* 12(17):3177-83.
- Lang, S., et al.
- 2008 Growth cone response to ephrin gradients produced by microfluidic networks. *Anal Bioanal Chem* 390(3):809-16.
- Lauffenburger, D., C. Rothman, and S. H. Zigmond
- 1983 Measurement of leukocyte motility and chemotaxis parameters with a linear under-agarose migration assay. *J Immunol* 131(2):940-7.
- Le Berre, Maël, et al.
- 2014 Chapter 14 - Methods for Two-Dimensional Cell Confinement. *In* *Methods in Cell Biology*. M. Piel and M. Théry, eds. Pp. 213-229: Academic Press.
- Leng, T., et al.
- 2004 Directed retinal nerve cell growth for use in a retinal prosthesis interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(11):4132-7.
- Letourneau, P. C.
- 1975 Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol* 44(1):92-101.
-
- 1978 Chemotactic Response of Nerve-Fiber Elongation to Nerve Growth-Factor. *Dev Biol* 66(1):183-196.
- Levimontalcini, R.
- 1987 The Nerve Growth-Factor 35 Years Later. *Science* 237(4819):1154-1162.

Ley, K., et al.

2007 Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7(9):678-89.

Li, G. N., J. Liu, and D. Hoffman-Kim

2008 Multi-molecular gradients of permissive and inhibitory cues direct neurite outgrowth. *Ann Biomed Eng* 36(6):889-904.

Liang, C. C., A. Y. Park, and J. L. Guan

2007 In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2(2):329-33.

Lim, K., et al.

2015 Neutrophil trails guide influenza-specific CD8(+) T cells in the airways. *Science* 349(6252):aaa4352.

Lin, F., et al.

2005 Neutrophil migration in opposing chemoattractant gradients using microfluidic chemotaxis devices. *Ann Biomed Eng* 33(4):475-82.

Liu, Yi, and Hang Lu

2016 Microfluidics in systems biology—hype or truly useful? *Current Opinion in Biotechnology* 39(Supplement C):215-220.

Loike, J. D., et al.

1999 Differential regulation of beta1 integrins by chemoattractants regulates neutrophil migration through fibrin. *J Cell Biol* 144(5):1047-56.

Loike, J. D., et al.

1995 Fibrin regulates neutrophil migration in response to interleukin 8, leukotriene B4, tumor necrosis factor, and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Exp Med* 181(5):1763-72.

Lomakina, E. B., G. Marsh, and R. E. Waugh

2014 Cell surface topography is a regulator of molecular interactions during chemokine-induced neutrophil spreading. *Biophys J* 107(6):1302-12.

Lowry, M. C., W. M. Gallagher, and L. O'Driscoll

2015 The Role of Exosomes in Breast Cancer. *Clin Chem* 61(12):1457-65.

Lund, F. W., and D. Wustner

- 2013 A comparison of single particle tracking and temporal image correlation spectroscopy for quantitative analysis of endosome motility. *J Microsc* 252(2):169-88.
- Lyv, X., et al.
- 2017 An integrated method for cell isolation and migration on a chip. *Sci Rep* 7(1):8963.
- Lyons, J. G., et al.
- 2008 Clonal diversity in carcinomas: its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions. *Clin Exp Metastasis* 25(6):665-77.
- Mai, J., et al.
- 2009 Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J Neurosci* 29(23):7450-8.
- Majumdar, R., M. Sixt, and C. A. Parent
- 2014 New paradigms in the establishment and maintenance of gradients during directed cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 30:33-40.
- Majumdar, R., A. T. Tameh, and C. A. Parent
- 2016 Exosomes Mediate LTB4 Release during Neutrophil Chemotaxis. *Plos Biology* 14(1).
- Manley, S., et al.
- 2008 High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods* 5(2):155-157.
- Mann, F., et al.
- 1998 Membrane-associated molecules guide limbic and nonlimbic thalamocortical projections. *J Neurosci* 18(22):9409-19.
- Mantovani, A.
- 2009 The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell* 16(3):173-4.
- Mantovani, A., et al.
- 2008 Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203):436-44.
- Mantovani, A., et al.
- 2011 Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11(8):519-31.

Maragos, P.

1996 Differential morphology and image processing. *IEEE Trans Image Process* 5(6):922-37.

Marcum, and James A. Marcum

2015 Thomas Kuhn's Revolutions : A Historical and an Evolutionary Philosophy of Science?

Marella, N. V., et al.

2009 Cytogenetic and cDNA microarray expression analysis of MCF10 human breast cancer progression cell lines. *Cancer Res* 69(14):5946-53.

Markiewski, M. M., et al.

2008 Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 9(11):1225-35.

Markiewski, M. M., and J. D. Lambris

2009 Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol* 30(6):286-92.

Markiewski, M. M., et al.

2017 The Ribosomal Protein S19 Suppresses Antitumor Immune Responses via the Complement C5a Receptor 1. *J Immunol* 198(7):2989-2999.

Massena, S., et al.

2010 A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116(11):1924-31.

Mazzaferri, J., S. Costantino, and S. Lefrancois

2013 Analysis of AQP4 Trafficking Vesicle Dynamics Using a High-Content Approach. *Biophysical Journal* 105(2):328-337.

Mazzaferri, J., et al.

2015 Adaptive settings for the nearest-neighbor particle tracking algorithm. *Bioinformatics* 31(8):1279-85.

McCormick, A. M., and N. D. Leipzig

2012 Neural regenerative strategies incorporating biomolecular axon guidance signals. *Ann Biomed Eng* 40(3):578-97.

McCutcheon, M.

- 1946 Chemotaxis in leukocytes. *Physiol Rev* 26(3):319-36.
- McDonald, B., et al.
- 2010 Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330(6002):362-6.
- McDonald, J. C., et al.
- 2000 Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21(1):27-40.
- McFarlane, S.
- 2000 Attraction vs. repulsion: the growth cone decides. *Biochem Cell Biol* 78(5):563-8.
- McLaughlin, T., R. Hindges, and D. D. O'Leary
- 2003 Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 13(1):57-69.
- Meijering, E., O. Dzyubachyk, and I. Smal
- 2012 Methods for Cell and Particle Tracking. *Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells: Optical and Spectroscopic Techniques* 504:183-200.
- Mellor, D. M., D. B. Myers, and V. S. Chadwick
- 1986 The cored sponge model of in vivo leucocyte chemotaxis. *Agents Actions* 18(5-6):550-4.
- Metschnikoff
- 1887 Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Annales de l'Institut Pasteur* 1(7):321-335.
- Metschnikoff, E.
- 1891 Lecture on Phagocytosis and Immunity. *Br Med J* 1(1570):213-7.
- Meyer, Fernand
- 1994 Topographic distance and watershed lines. *Signal Processing* 38(1):113-125.
- Meyer, S., J. H. Leusen, and P. Boross
- 2014 Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *MAbs* 6(5):1133-44.
- Mishalian, I., Z. Granot, and Z. G. Fridlender
- 2017 The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology* 222(1):82-88.

- Moghe, P. V., R. D. Nelson, and R. T. Tranquillo
 1995 Cytokine-stimulated chemotaxis of human neutrophils in a 3-D conjoined fibrin gel assay. *J Immunol Methods* 180(2):193-211.
- Monneau, Y., F. Arenzana-Seisdedos, and H. Lortat-Jacob
 2015 The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells. *J Leukoc Biol.*
- Monnier, P. P., et al.
 2003 The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* 22(3):319-30.
- Monschau, B., et al.
 1997 Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J* 16(6):1258-67.
- Moore, S. W., N. Biais, and M. P. Sheetz
 2009 Traction on immobilized netrin-1 is sufficient to reorient axons. *Science* 325(5937):166.
- Moore, S. W., et al.
 2012 Netrin-1 Attracts Axons through FAK-Dependent Mechanotransduction. *J Neurosci* 32(34):11574-85.
- Moreau-Fauvarque, C., et al.
 2003 The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J Neurosci* 23(27):9229-39.
- Mortimer, D., et al.
 2009 Bayesian model predicts the response of axons to molecular gradients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(25):10296-301.
- Mortimer, D., et al.
 2010 Axon guidance by growth-rate modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(11):5202-7.
- Mouneimne, G., et al.

- 2004 Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol* 166(5):697-708.
- Moutasim, K. A., M. L. Nystrom, and G. J. Thomas
- 2011 Cell migration and invasion assays. *Methods Mol Biol* 731:333-43.
- Nabizadeh, J. A., et al.
- 2016 The Complement C3a Receptor Contributes to Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Neutrophil and CD4⁺ T Cell Responses. *J Immunol* 196(11):4783-92.
- Nathan, C.
- 2006 Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6(3):173-82.
- Nedelec, S., et al.
- 2012 Concentration-dependent requirement for local protein synthesis in motor neuron subtype-specific response to axon guidance cues. *J Neurosci* 32(4):1496-506.
- Nelson, R. D., P. G. Quie, and R. L. Simmons
- 1975 Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 115(6):1650-6.
- Niedel, J., S. Wilkinson, and P. Cuatrecasas
- 1979 Receptor-mediated uptake and degradation of ¹²⁵I-chemotactic peptide by human neutrophils. *J Biol Chem* 254(21):10700-6.
- Nielson, R., B. Koehr, and J. B. Shear
- 2009 Microreplication and Design of Biological Architectures Using Dynamic-Mask Multiphoton Lithography. *Small* 5(1):120-125.
- Nitta, H., et al.
- 2013 Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a receptor (CD88). *Clin Cancer Res* 19(8):2004-13.
- O'Connor, T. P., J. S. Duerr, and D. Bentley
- 1990 Pioneer growth cone steering decisions mediated by single filopodial contacts in situ. *J Neurosci* 10(12):3935-46.
- Oliva, A. A., Jr., et al.

- 2003 Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. *Neurochem Res* 28(11):1639-48.
- Otsu, N
- 1979 A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9(1):62-66.
- Oudin, M. J., and V. M. Weaver
- 2016 Physical and Chemical Gradients in the Tumor Microenvironment Regulate Tumor Cell Invasion, Migration, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 81:189-205.
- Pankova, K., et al.
- 2010 The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67(1):63-71.
- Perl, A., D. N. Reinhoudt, and J. Huskens
- 2009 Microcontact Printing: Limitations and Achievements. *Advanced Materials* 21(22):2257-2268.
- Petter, Portin
- 2015 The Development of Genetics in the Light of Thomas Kuhn's Theory of Scientific Revolutions. *Recent Advances in DNA & Gene Sequences (Discontinued)* 9(1):14-25.
- Phillipson, M., and P. Kubes
- 2011 The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17(11):1381-90.
- Prat, A., et al.
- 2010 Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12(5):R68.
- Price, J. T., et al.
- 1999 Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res* 59(21):5475-8.
- Qi, X., et al.
- 2017 Optical sorting and cultivation of denitrifying anaerobic methane oxidation archaea. *Biomed Opt Express* 8(2):934-942.

Qin, D., Y. Xia, and G. M. Whitesides

2010 Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat Protoc* 5(3):491-502.

Quist, A. P., E. Pavlovic, and S. Oscarsson

2005 Recent advances in microcontact printing. *Anal Bioanal Chem* 381(3):591-600.

Rajasekharan, S., and T. E. Kennedy

2009 The netrin protein family. *Genome Biol* 10(9):239.

Reichardt, L. F., and K. J. Tomaselli

1991 Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14:531-70.

Riahi, N., et al.

2017 Bioavailability of immobilized epidermal growth factor: Covalent versus noncovalent grafting. *Biointerphases* 12(1):010501.

Ricoult, S. G., T. E. Kennedy, and D. Juncker

2015 Substrate-bound protein gradients to study haptotaxis. *Front Bioeng Biotechnol* 3:40.

Rigby, D. A., et al.

2015 Neutrophils rapidly transit inflamed lymphatic vessel endothelium via integrin-dependent proteolysis and lipoxin-induced junctional retraction. *J Leukoc Biol* 98(6):897-912.

Rink, I., et al.

2015 A haptotaxis assay for leukocytes based on surface-bound chemokine gradients. *J Immunol* 194(11):5549-58.

Roca-Cusachs, P., R. Sunyer, and X. Trepat

2013 Mechanical guidance of cell migration: lessons from chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol* 25(5):543-9.

Rodger, J., L. Salvatore, and P. Migani

2012 Should I stay or should I go? Ephs and ephrins in neuronal migration. *Neurosignals* 20(3):190-201.

Rogers, Everett Mitchell

1962 Diffusion of innovations. New York: New York : Free Press of Glencoe.

—

- 2003 Diffusion of innovations. New York
Toronto: New York
Toronto : Free Press.
- Rose, A. A., et al.
- 2010 ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. PLoS One 5(8):e12093.
- Rose, A. A., et al.
- 2007 Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. Mol Cancer Res 5(10):1001-14.
- Rosoff, W. J., et al.
- 2004 A new chemotaxis assay shows the extreme sensitivity of axons to molecular gradients. Nat Neurosci 7(6):678-82.
- Rot, A.
- 1992 Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. Immunol Today 13(8):291-4.
-
- 1993 Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. Eur J Immunol 23(1):303-6.
- Rot, A., et al.
- 1987 A series of six ligands for the human formyl peptide receptor: tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A 84(22):7967-71.
- Roussos, E. T., J. S. Condeelis, and A. Patsialou
- 2011 Chemotaxis in cancer. Nat Rev Cancer 11(8):573-87.
- Roy, J., T. E. Kennedy, and S. Costantino
- 2013 Engineered cell culture substrates for axon guidance studies: moving beyond proof of concept. Lab Chip 13(4):498-508.
- Roy, J., et al.
- 2017 A Haptotaxis Assay for Neutrophils using Optical Patterning and a High-content Approach. Sci Rep 7(1):2869.
- Ruprecht, V., et al.

- 2017 How cells respond to environmental cues - insights from bio-functionalized substrates. *Journal of Cell Science* 130(1):51-61.
- Sackmann, E. K., et al.
- 2014 Characterizing asthma from a drop of blood using neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(16):5813-8.
- Sackmann, E. K., et al.
- 2012 Microfluidic kit-on-a-lid: a versatile platform for neutrophil chemotaxis assays. *Blood* 120(14):e45-53.
- Sagiv, J. Y., et al.
- 2015 Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep* 10(4):562-73.
- Sahai, E., and C. J. Marshall
- 2003 Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5(8):711-9.
- Santner, S. J., et al.
- 2001 Malignant MCF10CA1 cell lines derived from premalignant human breast epithelial MCF10AT cells. *Breast Cancer Res Treat* 65(2):101-10.
- Sarris, M., et al.
- 2012 Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol* 22(24):2375-82.
- Savaskan, N. E., et al.
- 1999 Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro. *Eur J Neurosci* 11(1):316-26.
- Saxton, M. J.
- 1993 Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys J* 64(6):1766-80.
- Schiffmann, E., B. A. Corcoran, and S. M. Wahl
- 1975a N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(3):1059-62.
-

1975b N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(3):1059-1062.

Schwarz, J., et al.

2016 A microfluidic device for measuring cell migration towards substrate-bound and soluble chemokine gradients. *Sci Rep* 6:36440.

Schwarz, J., and M. Sixt

2016 Quantitative Analysis of Dendritic Cell Haptotaxis. *Methods Enzymol* 570:567-81.

Schwarz, Jan, et al.

2017 Dendritic Cells Interpret Haptotactic Chemokine Gradients in a Manner Governed by Signal-to-Noise Ratio and Dependent on GRK6. *Current Biology* 27(9):1314-1325.

Scott, M. A., Z. D. Wissner-Gross, and M. F. Yanik

2012a Ultra-rapid laser protein micropatterning: screening for directed polarization of single neurons. *Lab on a Chip* 12(12):2265-76.

—

2012b Ultra-rapid laser protein micropatterning: screening for directed polarization of single neurons. *Lab Chip* 12(12):2265-76.

Serge, A., et al.

2008 Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nature Methods* 5(8):687-694.

Serhan, C. N., N. Chiang, and T. E. Van Dyke

2008 Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8(5):349-61.

Shaul, M. E., and Z. G. Fridlender

2017 Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *J Leukoc Biol* 102(2):343-349.

Shaul, M. E., et al.

2016 Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFbeta modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology* 5(11):e1232221.

Shen, M., et al.

2014 Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9(6):e98259.

Shi, C., et al.

2013 Interaction of motility, directional sensing, and polarity modules recreates the behaviors of chemotaxing cells. *PLoS Comput Biol* 9(7):e1003122.

Siddiqui, R. A., et al.

1999 Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. *J Immunol* 162(2):1077-83.

Singhvi, R., et al.

1994 Engineering cell shape and function. *Science* 264(5159):696-8.

Soehnlein, O., and L. Lindbom

2010 Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10(6):427-39.

Song, H., et al.

1998 Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281(5382):1515-8.

Song, H., and M. Poo

2001 The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3(3):E81-8.

Song, L., et al.

2006 Dictyostelium discoideum chemotaxis: threshold for directed motion. *Eur J Cell Biol* 85(9-10):981-9.

Soon, L., et al.

2005 Description and characterization of a chamber for viewing and quantifying cancer cell chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 62(1):27-34.

Sperry, R. W.

1963 Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:703-10.

Stanger, B. Z., and M. L. Kahn

2013 Platelets and tumor cells: a new form of border control. *Cancer Cell* 24(1):9-11.

Stein, Brian, Yeesim Khew-Goodall, and Mathew Vadas

- 2001 Transmigration of Leukocytes. *In* Physiology of Inflammation. K. Ley, ed. Pp. 338-380. New York, NY: Springer New York.
- Stein, E., and M. Tessier-Lavigne
- 2001 Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291(5510):1928-38.
- Summers, C., et al.
- 2010 Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31(8):318-24.
- Sung, B. H., et al.
- 2015 Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun* 6:7164.
- Suraneni, P., et al.
- 2012 The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *Journal of Cell Biology* 197(2):239-251.
- Swann, J. B., and M. J. Smyth
- 2007 Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117(5):1137-46.
- Tabaries, S., et al.
- 2011 Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene* 30(11):1318-28.
- Tabaries, S., et al.
- 2015 Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. *Breast Cancer Res* 17:45.
- Talkenberger, K., et al.
- 2017 Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments. *Sci Rep* 7(1):9237.
- Tan, A. M., et al.
- 2001 Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. *Lab Chip* 1(1):7-9.
- Tan, S. J., et al.
- 2009 Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed Microdevices* 11(4):883-92.
- Tang, M., et al.

- 2014 Evolutionarily conserved coupling of adaptive and excitable networks mediates eukaryotic chemotaxis. *Nat Commun* 5:5175.
- Taraboletti, G., D. D. Roberts, and L. A. Liotta
- 1987 Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol* 105(5):2409-15.
- Taylor, A. M., and N. L. Jeon
- 2010 Micro-scale and microfluidic devices for neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 20(5):640-7.
- Taylor, A. M., S. W. Rhee, and N. L. Jeon
- 2006 Microfluidic chambers for cell migration and neuroscience research. *Methods Mol Biol* 321:167-77.
- Tecchio, C., A. Micheletti, and M. A. Cassatella
- 2014 Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* 5:508.
- Tessier-Lavigne, M., and C. S. Goodman
- 1996 The molecular biology of axon guidance. *Science* 274(5290):1123-33.
- Tharp, W. G., et al.
- 2006 Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 79(3):539-54.
- Theves, M., et al.
- 2013 A Bacterial Swimmer with Two Alternating Speeds of Propagation. *Biophysical Journal* 105(8):1915-1924.
- Thiery, J. P.
- 2002 Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6):442-54.
- Toetsch, S., et al.
- 2009 The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. *Integr Biol (Camb)* 1(2):170-81.
- Trellakis, S., et al.
- 2011 Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer* 129(9):2183-93.

Turunen, S., et al.

2011 Chemical and topographical patterning of hydrogels for neural cell guidance in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*.

Vadrevu, S. K., et al.

2014 Complement c5a receptor facilitates cancer metastasis by altering T-cell responses in the metastatic niche. *Cancer Res* 74(13):3454-65.

Valentine, M. T., et al.

2001 Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 64(6 Pt 1):061506.

van den Boomgaard, Rein, and Richard van Balen

1992 Methods for fast morphological image transforms using bitmapped binary images. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing* 54(3):252-258.

Ventura, M. T., et al.

1991 Human melanoma metastasis culture supernatant contains chemotactic factors for phagocytes. *J Clin Lab Anal* 5(1):21-4.

Vetter, I., Z. Pujic, and G. J. Goodhill

2010 The response of dorsal root ganglion axons to nerve growth factor gradients depends on spinal level. *J Neurotrauma* 27(8):1379-86.

Vincent, L., and P. Soille

1991 Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 13(6):583-598.

Vitriol, E. A., and J. Q. Zheng

2012 Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* 73(6):1068-81.

Vogt, A. K., et al.

2005 Independence of synaptic specificity from neuritic guidance. *Neuroscience* 134(3):783-90.

von Philipsborn, A., and M. Bastmeyer

2007 Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration. *Int Rev Cytol* 263:1-62.

von Philipsborn, A. C., et al.

2006a Microcontact printing of axon guidance molecules for generation of graded patterns. *Nat Protoc* 1(3):1322-8.

von Philipsborn, A. C., et al.

2006b Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients. *Development* 133(13):2487-95.

Walter, J., S. Henke-Fahle, and F. Bonhoeffer

1987a Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* 101(4):909-13.

Walter, J., et al.

1987b Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101(4):685-96.

Wang, Shur-Jen, et al.

2004 Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis. *Experimental Cell Research* 300(1):180-189.

Wang, X., et al.

2011 Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. *Lab Chip* 11(21):3656-62.

Ward, P. A., I. H. Lepow, and L. J. Newman

1968 Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. *The American Journal of Pathology* 52(4):725-736.

Warden, Glenn D., Arthur D. Mason, and Basil A. Pruitt

1974 Evaluation of Leukocyte Chemotaxis In Vitro in Thermally Injured Patients. *Journal of Clinical Investigation* 54(4):1001-1004.

Weigel, A. V., et al.

2011 Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single-molecule tracking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(16):6438-6443.

Weiger, M. C., et al.

2013 Real-time motion analysis reveals cell directionality as an indicator of breast cancer progression. *PLoS One* 8(3):e58859.

Weimann, L., et al.

2013 A Quantitative Comparison of Single-Dye Tracking Analysis Tools Using Monte Carlo Simulations. *Plos One* 8(5).

Wheeler, B. C., et al.

1999 Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture. *J Biomech Eng* 121(1):73-8.

Whitesides, G. M.

2006 The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442(7101):368-73.

Wiemann, B., and C. O. Starnes

1994 Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 64(3):529-64.

Wilkinson, P. C., and R. B. Allan

1978 Chemotaxis of neutrophil leukocytes towards substratum-bound protein attractants. *Exp Cell Res* 117(2):403-12.

Willert, C. E., and M. Gharib

1991 Digital particle image velocimetry. *Experiments in Fluids* 10(4):181-193.

Wissner-Gross, Z. D., et al.

2011a Large-scale analysis of neurite growth dynamics on micropatterned substrates. *Integr Biol (Camb)* 3(1):65-74.

Wissner-Gross, Z. D., et al.

2011b Large-scale analysis of neurite growth dynamics on micropatterned substrates. *Integrative Biology* 3(1):65-74.

Wong, J. T., S. T. Wong, and T. P. O'Connor

1999 Ectopic semaphorin-1a functions as an attractive guidance cue for developing peripheral neurons. *Nat Neurosci* 2(9):798-803.

Wu, M. C., et al.

2013 The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(23):9439-44.

Xu, N., X. Lei, and L. Liu

- 2011 Tracking neutrophil intraluminal crawling, transendothelial migration and chemotaxis in tissue by intravital video microscopy. *J Vis Exp* (55).
- Yang, K., et al.
- 2018 Mkit: A cell migration assay based on microfluidic device and smartphone. *Biosens Bioelectron* 99:259-267.
- Yang, K., et al.
- 2017 An All-on-chip Method for Rapid Neutrophil Chemotaxis Analysis Directly from a Drop of Blood. *J Vis Exp* (124).
- Yonker, L. M., et al.
- 2017 Development of a Primary Human Co-Culture Model of Inflamed Airway Mucosa. *Sci Rep* 7(1):8182.
- Yoshida, Y.
- 2012 Semaphorin signaling in vertebrate neural circuit assembly. *Front Mol Neurosci* 5:71.
- Young, E. W., and D. J. Beebe
- 2010 Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem Soc Rev* 39(3):1036-48.
- Zhang, C., et al.
- 2016 A microfluidic Transwell to study chemotaxis. *Exp Cell Res* 342(2):159-65.
- Zhang, Q., et al.
- 2010 Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464(7285):104-7.
- Zhang, Zhuo, and Sunitha Nagrath
- 2013 Microfluidics and cancer: are we there yet? *Biomedical Microdevices* 15(4):595-609.
- Zheng, S., et al.
- 2011 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomed Microdevices* 13(1):203-13.
- Zhou, Yufeng
- 2017 The recent development and applications of fluidic channels by 3D printing. *Journal of Biomedical Science* 24(1):80.

Zicha, D., G. A. Dunn, and A. F. Brown

1991 A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J Cell Sci* 99 (Pt 4):769-75.

Zicha, D., G. Dunn, and G. Jones

1997 Analyzing chemotaxis using the Dunn direct-viewing chamber. *Methods Mol Biol* 75:449-57.

Zigmond, S. H.

1974 Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 249(456):450-2.

—

1977 Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 75(2 Pt 1):606-16.

Zouki, C., et al.

1997 Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *Journal of Clinical Investigation* 100(3):522-529.

Annexe 1 : Article de revue sur le guidage axonal, « Lab-On-Chip »

Avant-propos

Dans la dernière décennie, les approches d'ingénierie biomédicale disponibles pour étudier la guidance axonale se sont multipliées. Cet article de revue focus sur la pertinence de chacune de ces approches ainsi que de la valeur ajoutée des découvertes qui en ont découlées.

Cet article a été mandaté au Dr Costantino par la revue 'Lab on a Chip', de par son expertise dans l'ingénierie de substrat de culture par laser. En effet, à l'origine, la technologie de photoblanchiment par laser 'LAPAP' fut développée pour suivre la migration des axones sur un substrat chimiotactique. Travaillant tant avec le LAPAP que sur l'étude de la migration cellulaire, c'était l'occasion pour moi, de participer à la rédaction d'un article de revue. Il est à noter que malgré que je travaille principalement sur la migration des neutrophiles et des cellules cancéreuses, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la chimiotaxie et de la guidance axonale sont similaires. Ainsi, plusieurs des approches méthodologiques sont les mêmes.

L'article conclu qu'alors que les biophysiciens développent des méthodologies puissantes, celles-ci sont encore peu utilisées à grande échelle par les biologistes. En perspective, c'est en formant une nouvelle génération de scientifiques pluridisciplinaires qu'on verra émerger le plein potentiel de ces technologies. Dr Costantino, Dr Kennedy et moi-même faisons d'ailleurs parti d'un de ces programmes visant la coopération entre scientifique de différents horizons, le 'NSERC-CREATE Training Program in Neuroengineering'.

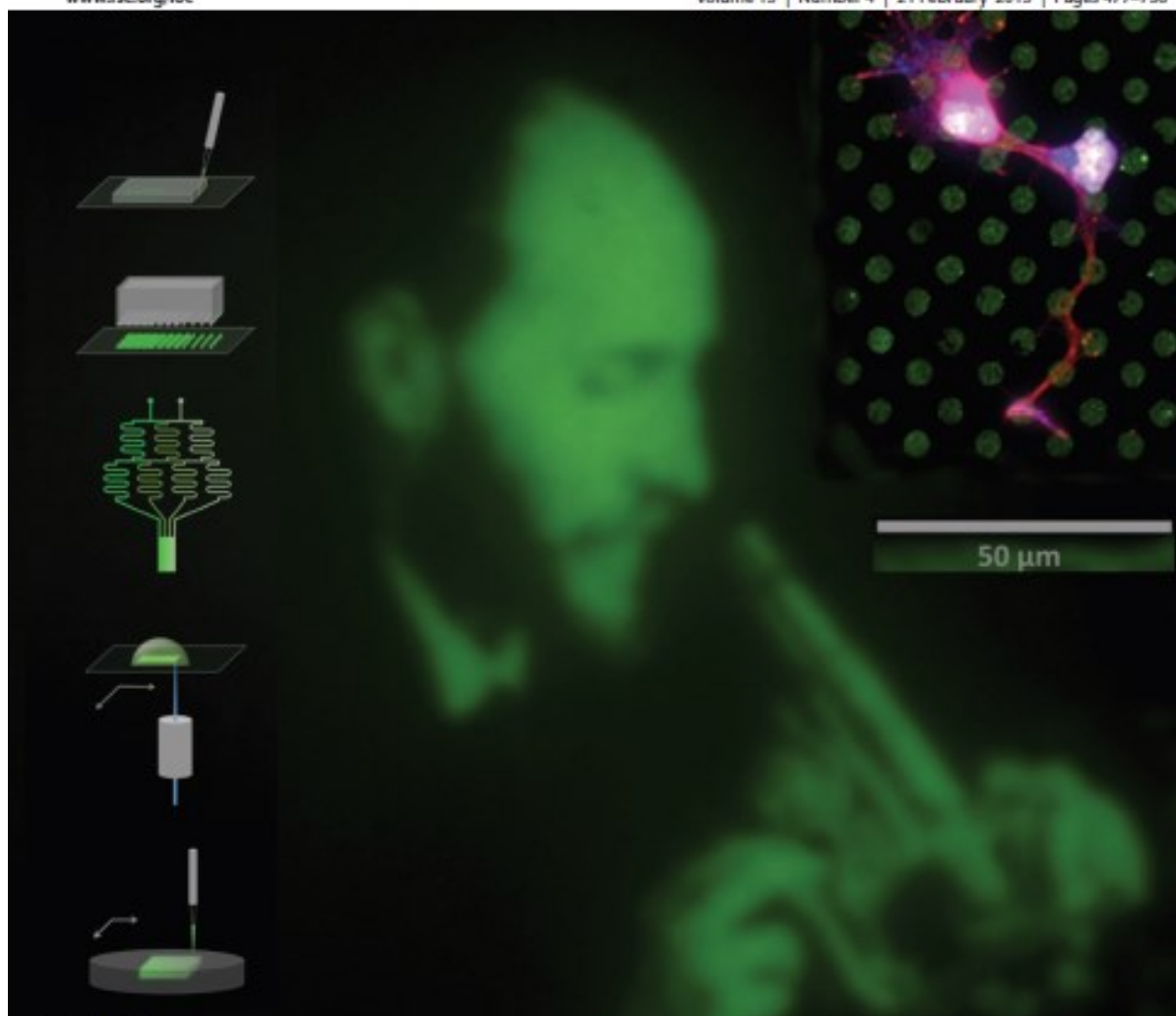
Donc, en plus d'acquérir des aptitudes de rédaction, en écrivant cet article, j'ai pu définir les objectifs et hypothèses de ma thèse et aussi bâtir ma revue de littérature. Pour ce qui est des contributions de chaque auteur à l'article, noton que Dr Costantino et moi-même avons tout d'abord établi les lignes directrice de l'article. j'ai contribué à la rédaction en rédigeant le premier jet de l'article, en sélectionnant des articles à inclure dans la revue. Finalement, j'ai aussi conçu et réalisé le tableau et la figure. Nous avons tous les trois rédigé et révisé les versions subséquentes de l'article.

Lab on a Chip

Miniaturisation for chemistry, physics, biology, materials science and bioengineering

www.rsc.org/loc

Volume 13 | Number 4 | 21 February 2013 | Pages 477–736



ISSN 1473-0197

RSC Publishing

CRITICAL REVIEW
Santiago Costantino et al.
Engineered cell culture substrates for axon guidance studies: moving beyond
proof of concept

Figure 47. Page couverture de « Lab on a Chip », volume 13, numéro 4

Engineered cell culture substrates for axon guidance studies: moving beyond proof-of concept.

Joannie Roy, Timothy E. Kennedy and Santiago Costantino

Received 31st August 2012, Accepted 9th November 2012
Lab Chip, 2013, 13, 498

Abstract

Promoting axon regeneration following injury is one of the ultimate challenges of neuroscience, and understanding the mechanisms that regulate axon growth and guidance is essential to achieve this goal. During development axons are directed over relatively long distances by a precise extracellular distribution of chemical signals in the embryonic nervous system. Multiple guidance proteins, including netrins, slits, semaphorins, ephrins and neurotrophins have been identified as key players in this process. During the last decade, engineered cell culture substrates have been developed to investigate the cellular and molecular mechanisms underlying axon guidance. This review is focused on the biological insights that have been achieved using new techniques that attempt to mimic *in vitro* the spatial patterns of proteins that growth cones encounter *in vivo*.

Introduction

Understanding the fundamental molecular mechanisms underlying axon guidance remains a challenging biological problem. The wiring of the nervous system is an autonomous process that creates a circuit several orders of magnitude more complex than the most sophisticated microchip ever produced. The formation of this overwhelmingly complex structure is ultimately governed by stochastic molecular interactions that repeatedly yield the same electrical design. Since the beginning of the last century, neuroscientists have made tremendous progress in identifying the molecules critical for directing extending axons to their synaptic targets (Dickson 2002; Song and Poo 2001; Tessier-Lavigne and Goodman 1996).

From a clinical perspective, obtaining a better understanding of axon guidance mechanisms is opening new avenues for the development of therapies in regenerative medicine. The possibility of reconnecting the nervous system after trauma or overcoming the impairments caused by a degenerative disease is the basis of substantial contemporary research that typically engage increasingly interdisciplinary teams. In particular, the combination of expertise in molecular biology with techniques in micro-fabrication is yielding an impressive array of new technologies and biomimetic materials.

Engineered culture substrates can now be tailored to investigate the response of growing axons challenged with highly detailed spatial distributions of molecules. Not surprisingly, these new technologies have played a major role in the progress toward understanding the effects of chemotactic and neurotropic factors. They have facilitated studying the behavior of neurons in controlled microenvironments and contributed to the identification of new guidance cues.

The goal of this article is not to review the latest technologies for studying axonal guidance, but rather to consider the biological insights that have been achieved as a result of the application of these new methods. The technical details of the most important methodologies (Keenan and Folch 2008; Toetsch, et al. 2009; Young and Beebe 2010), such as protein patterning (Blawas and Reichert 1998; Kane, et al. 1999), approaches to study diffusible axon guidance cues, such as the Campenot (Campenot 1977) and Dunn (Zicha, et al. 1991) chambers, 3-dimensional functionalization of hydrogels (Turunen, et al. 2011), and microfluidics (McDonald, et al. 2000) have been extensively reviewed.

We begin with a brief and simple introduction to axon guidance to present the basic mechanisms and some of the ligands that demonstrated to contribute to axon pathfinding. We provide a brief historical overview of pioneering studies that have driven the field and consider their main discoveries. The essential biological contributions of the different technologies are presented, grossly divided by categories. We close with a personal view of the progress achieved so far in the area and the present and future challenges.

Axon pathfinding and guidance cues

An axon pursuing its target faces enormous challenges in the developing embryo. The distance to its final destination can be relatively large and, to get there, it must correctly interpret a multitude of cues embedded in a highly rich and dynamic environment. Multiple studies have established that although synaptic activity refines neuronal circuits once they have been established, extracellular molecular cues are the critical stimulus that initially directs axons to their targets. Axons appear to use three main strategies to reach their goal: they extend early during development when distances are smaller, they utilize intermediate targets that break up long complex trajectories into smaller more manageable steps, and axons that extend later in development often migrate using cell-cell interaction either along radial glia or fasciculating with and follow earlier pioneer axons.

The growth cone at the tip of an axon is a motile structure that is sensitive to guidance cues in its environment (Dent and Gertler 2003; Huber, et al. 2003). The outer domain of a growth cone is composed of filopodia and lamellipodia, highly dynamic membrane protrusions at the leading edge of many motile cells (Vitriol and Zheng 2012). Filopodia are thin finger-like extensions of actin bundles that can probe the surrounding environment. Lamellipodia are flattened veils of membrane, with a dense actin meshwork between the filopodia. It has been shown that the contact of the tip of a single filopodium with an appropriate extracellular target is sufficient to cause a growth cone to turn (Chien, et al. 1993; O'Connor, et al. 1990), indicating that receptors for guidance cues are present at the tips of growth cone filopodia. Disruption of these structures causes errors in axon guidance (Bentley and Toroian-Raymond 1986; Keshishian and Bentley 1983). Hence, as growth cones probe their local environment, by extending and retracting filopodia and lamellipodia, guidance in one direction or another occurs through selective stabilization of these F-actin-based membrane protrusions on one side, coupled with the withdrawal and collapse of the trailing edge on the opposite side.

Although multiple families of axon guidance cues have been identified and their number continues to increase, the diversity of known cues is small in light of the immense complexity of the nervous system. Multiple extracellular matrix (ECM) components influence axon extension during neural development (Kiryushko, et al. 2004; Reichardt and Tomaselli 1991).

Among these, the laminin family is notable. Many types of neurons, derived from either the central nervous system (CNS) or the peripheral nervous system, readily extend axons on laminin. Laminins are a major component of basement membranes, a layer of ECM found at the base of epithelia (Reichardt and Tomaselli 1991). Multiple proteins interact with laminins. Laminin is known to promote axon regeneration in the peripheral nervous system following injury (Ide, et al. 1983) and depletion of laminin from preparations of peripheral nerve myelin substantially reduces its capacity to promote axon growth. Laminin-1 is very commonly used as a permissive substrate that promotes axon outgrowth in cell culture. It has been shown to exert a modulatory influence, changing the response of growth cones to gradients of other guidance molecules (Hopker, et al. 1999; McFarlane 2000).

Netrins are a small family of laminin-related proteins that direct axon outgrowth during embryogenesis (Lai Wing Sun, et al. 2011; Rajasekharan and Kennedy 2009). They are bifunctional, attracting some axons and repelling others. Although netrins 1–4 are secreted and are often studied as diffusible cues, *in vivo* they are tightly associated with the ECM and recent studies have focused on the contribution of adhesion to netrin function. For example, recent studies indicate that netrins must be anchored or immobilized in order to influence axon growth (Mai, et al. 2009; Moore, et al. 2009; Moore, et al. 2012).

Slits were initially identified as axonal repellents at the embryonic CNS midline (Kaprielian, et al. 2000). In addition, Robos, which are receptors for Slits, also exert a neuromodulatory function. For example, Robo contributes to silencing of netrin 1–DCC signaling in commissural axons once they reach the ventral midline of the embryonic spinal cord (Stein and Tessier-Lavigne 2001). Functional contributions of Slits and Robos have now been demonstrated at many phases of brain development (Dickson 2001).

Semaphorins are a large family of secreted and membrane-associated proteins. The first evidence that semaphorins function as axonal chemorepellents was provided by the demonstration that semaphorin 3A, could collapse sensory ganglion growth cones *in vitro* (Stein and Tessier-Lavigne 2001). Although they are best understood for their role as repellents that affect axon steering, fasciculation, and branching (de Wit and Verhaagen 2003; Kolodkin and Ginty 1997; Yoshida 2012), like many axon guidance cues, they are bifunctional and also promote the growth of some axons (Song, et al. 1998; Wong, et al. 1999).

Graded expression of ephrins across the tectum, and complementary gradients of their receptors, the Eph tyrosine kinases, play key roles directing the projection of the retina to the tectum (Himanen and Nikolov 2003). EphA receptor expression by retinal ganglion cells is also graded and ephrin-As in the tectum direct the topographic projection of retinal ganglion cells (RGC) axons along the tectal anterior/posterior axis. Complementing this, graded expression of EphB receptors by retinal ganglion cells and ephrin-Bs in the tectum direct the formation of lateral to medial projections into the tectum (McLaughlin, et al. 2003; Rodger, et al. 2012).

Finally, the neurotrophins are a group of secreted growth factors, associated with synaptic plasticity, axon growth and survival, but when presented as a gradient, they can act as guidance cues (McCormick and Leipzig 2012; Rosoff, et al. 2004). In particular, nerve growth factor (NGF) (Huang and Reichardt 2001; Levimontalcini 1987) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Kidane, et al. 2009) can influence axon extension by regulating signal transduction mechanisms that direct actin remodeling (Gallo and Letourneau 2004; Letourneau 1978).

Although we focus here on axon guidance by patterns of substrate bound proteins, we acknowledge that not all such guidance cues encountered *in vivo* are bound to substrates or extracellular matrix, nor are they necessarily always proteins. Guidance can involve proteoglycans or growth factors and other soluble molecules, and even non-molecular interactions, such as stereotropism, where migrating cells will follow structural discontinuities in their local environment.

Brief historical perspective

Engineered cell culture substrates attempt to mimic the graded expression of proteins that axons encounter *in vivo*. Discoveries made by Roger Sperry in the early 1940s provided strong evidence that chemical gradients direct axon growth (Sperry 1963). As a result, it became essential to identify the key molecular players, characterize their distribution *in vivo*, and attempt to reproduce these distributions experimentally *in vitro*. With the goal of studying how neurons respond to the identified guidance cues, studies sought to measure cell survival, axon extension, growth cone turning and branching, all of which have begun to provide new insight into how cells interpret spatial information. As a first order approximation, graded distributions can be

depicted by their mean concentration and slope, and the majority of studies so far have aimed to address these two parameters.

The first studies to apply substrate engineering as a tool for neuroscience appeared in the late seventies. Work by Letourneau and colleagues illustrated the use of electron microcopy calibration grids to both deposit metals on coated surfaces and to function as masks for UV irradiation for neuronal culture substrates. Cell adhesion on patterned dishes could quantitatively demonstrate *in vitro* that growth cones avoided non-permissive areas of the substrate when choosing the pathway along which to extend (Hammarback, et al. 1985; Letourneau 1975). Furthermore, the adhesive guidepost hypothesis was tested using substrates with laminin coated squares separated by non-adhesive regions of variable width (Hammarback and Letourneau 1986).

A series of pioneering studies that used substrate engineering to investigate axon growth was carried out by Bonhoeffer and colleagues more than two decades ago (Walter, et al. 1987b). In contrast to destructive methods that generated non-permissive regions by denaturing proteins with UV light, their “stripe assay” allowed substrates to be patterned by depositing different solutions of membrane fragments in separate lanes on Nuclepore filters that were then used to support neurite outgrowth. Mimicking choices made by these axons *in vivo*, they found that temporal retinal axons demonstrate a preference to grow on membranes derived from the anterior rather than posterior tectum. They showed *in vitro* that this preference disappears for tectal membranes derived from chick brains that were more than two weeks old, coinciding with the completion of the development of retinotectal projections *in vivo*. On the basis of these studies they concluded that a repellent molecule in the membrane solutions was selectively recognized by temporal axons (Walter, et al. 1987a). This tectal repellent (ephrin-A5) was subsequently shown to be expressed in a spatiotemporal graded pattern during development (Drescher, et al. 1995) and then found to be a ligand for Eph-related tyrosine kinases (Monschau, et al. 1997). A detailed protocol for generating such stripes to test the response of growing axons, as well as migrating cells, is available (Knoll, et al. 2007).

In a series of early studies, Gundersen, Park, and their colleagues used brass blocks to make patterns of substrate bound NGF to demonstrate that growth cones of one-week-old ganglia were responsive to such patterns, but not two-week old ganglia (Gundersen 1985; Gundersen

and Park 1984). Later, the development of micro-contact printing (μ CP) (Kumar and Whitesides 1993) and its use in cell biology (Chen, et al. 1997; Singhvi, et al. 1994) substantially increased the capacity to present complex patterns of substrate bound protein to cells in culture. The growth cones of mammalian neurons are typically in the range of approximately 10-20 μ m wide and the capacity of μ CP to engineer cell culture substrates with micron resolution therefore has the potential to probe the mechanisms that neurons use to explore the microenvironment at an unprecedented level of detail. Such techniques have allowed the investigation of cell adhesion sites (Falconnet, et al. 2006; Kidane, et al. 2009), the production of graded distributions of printed protein dots (von Philipsborn, et al. 2006a; von Philipsborn, et al. 2006b) and the generation of continuous gradients (Mai, et al. 2009).

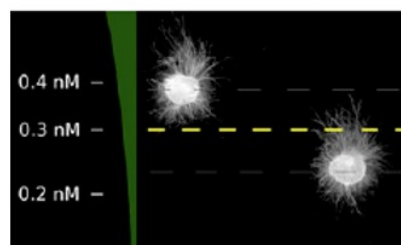
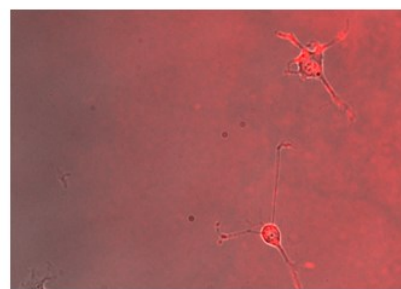
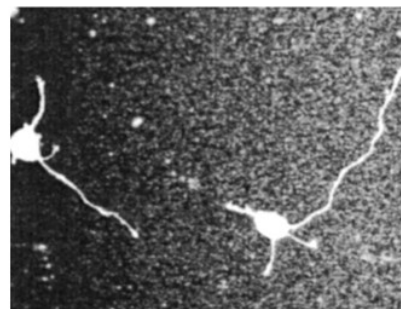
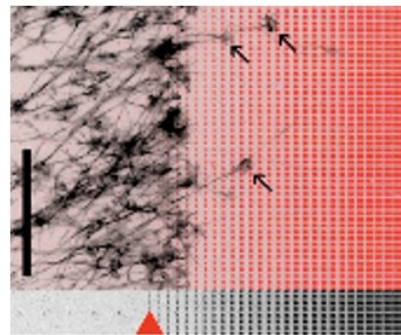
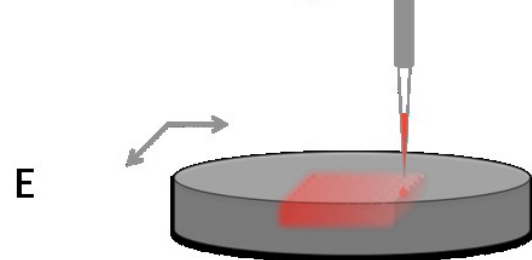
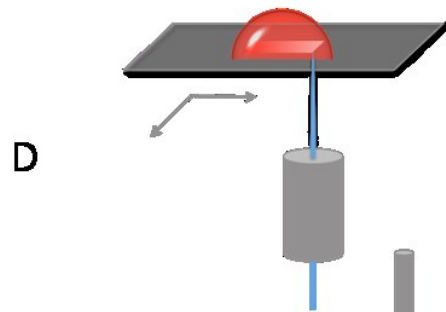
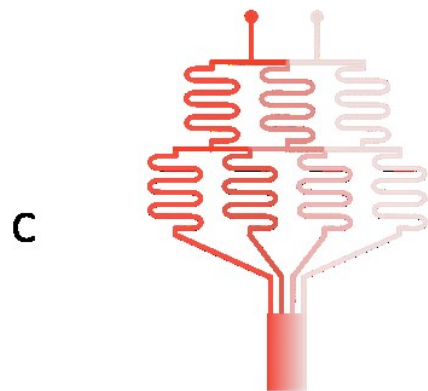
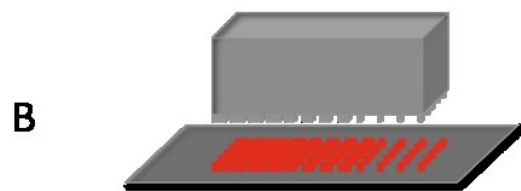
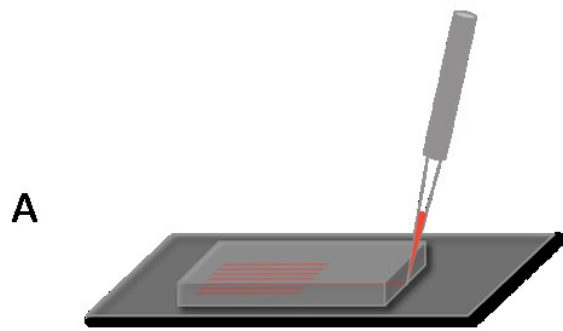


Figure 48. **Engineered culture substrates**

(a) stripe assay: a silicone matrix attached to a coverslip containing multiple channels is filled with a solution of guidance proteins using a syringe or a vacuum system. On the right are stripes of permissive laminin alternating with axon growth inhibitor Sema4D Reprinted with permission from (Moreau-Fauvarque, et al. 2003). Copyright 2006, Society for Neuroscience. (b) Microcontact printing: PDMS stamp with micrometer- scale patterned surface is used to transfer compounds to a cell culture surface. On the right, nasal RGC growth cones stop when exposed to an ephrin gradient. Reprinted with permission from (von Philipsborn, et al. 2006b). Copyright 2003, The Company of Biologists. (c) Microfluidics devices: a PDMS block engraved with channels and reservoirs is sealed with a coverslip. The serpentine mixer repeatedly mixes and divides solutions to produce concentration gradients. On the right, rat hippocampal neurons exposed to a laminin gradient. Reprinted with permission from (Dertinger, et al. 2002). Copyright 2002, National Academy of Sciences. (d) Laser-assisted patterning: a laser excites and crosslinks molecules on a cell culture substrate. Protein patterns are made by scanning the surface and varying the laser intensity. On the right, RGC-5 cells guided on a laminin-1 gradient. Reprinted with permission from (Belisle, et al. 2012). Copyright 2012, Creative Commons. (e) Patterning 3D hydrogels: nanoliter droplets of proteins are deposited on a collagen matrix using pump and a motorized stage. On the right, DRGs on the growth-rate modulator NGF. Reprinted with permission form (Mortimer, et al. 2010). Copyright 2010, National Academy of Sciences.

Stripe assay

As stated above, the stripe assay was originally developed to study axonal guidance mechanisms implicated in the development of the visual system (Walter, et al. 1987a; Walter, et al. 1987b). The implementation of the assay requires the fabrication of striped carpets on glass, plastic or Nuclepore membranes using a specially manufactured matrix of channels that are filled with protein solution (Figure 48A). Although the patterns that can be obtained with this technology are simple and not particularly versatile, it is one of the most widely used for neuroscience research of all technologies reviewed here. This technique succeeded to become a standard assay in larger studies, where the molecular biology and signaling pathways of axon guidance are analyzed in depth, providing information that is complementary to more classical molecular biology approaches like western blotting, directed mutagenesis, antibody and drug inhibition, and transgenic animal models. Importantly, quantification of the results obtained with this assay is relatively straightforward and provides an accurate way to determine how axons respond to the pattern. It has been used as a basis for the discovery of guidance cues, to investigate outgrowth and regeneration, and to dissect signal transduction mechanisms underlying axon guidance.

As an example, this protocol was used to investigate the role of serum response factor (SRF) in neurite outgrowth and axon guidance (Knoll, et al. 2006). In this study, hippocampal neurons derived from an SRF-deficient mouse grown on stripes of ephrin-A5 were found to be less sensitive to this repulsive cue, providing evidence that SRF regulates the guidance of mossy fiber axons. This assay was also used to examine the function of EphA in axon guidance from the vomeronasal organ (VNO) to the olfactory bulb (Knoll, et al. 2001). The differential expression of ephrin-A5 in the VNO and the graded expression of EphA6 in the accessory olfactory bulb was studied. The stripe assay revealed that VNO axons would preferentially grow on lanes containing EphA6. The stripe assay was also used to demonstrate that the preferential growth of thalamic and cortical axons on stripes containing recombinant limbic system-associated membrane protein (LAMP). In a loss of function analysis, when antibodies against LAMP were added, the preference disappeared (Mann, et al. 1998).

Myelin inhibits axon regeneration in the CNS and the stripe assay has been used to challenge neurons with myelin and investigate the underlying mechanism (Savaskan, et al. 1999). The authors used cortical neurons grown on membranes derived from the hippocampus at different developmental stages (from postnatal day 0 (P0) to day 60 (P60)). Newborn rat entorhinal cortex neurons, which project to the hippocampus, preferentially extended on early postnatal membranes. The study also demonstrated increased axon elongation on adult membranes when myelin was inactivated with a monoclonal antibody or when the membranes were depleted of myelin. Nevertheless, when presented with a choice between P0 and P>15 membranes, axons extended preferentially on P0 membranes regardless of myelin treatment, consistent with the P0 membranes either containing a growth promoting factor that the older membranes lack, or that multiple inhibitory cues are present in the older membranes.

The role of axon growth inhibition by glycosaminoglycans, such as chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG), which are major inhibitors in myelin, has been investigated using the stripe assay and retinal neurons (Monnier, et al. 2003). This study documented a dose dependent inhibition of axon growth by CSPGs and that incubation of retinal explants with inhibitors of downstream effectors of CSPG signal transduction reduced the effect.

As last examples, two studies used this assay to address semaphorin function as an inhibitor associated with CNS lesions. One group reported that Sema4D is upregulated in CNS lesions

and used the stripe assay to demonstrate a growth inhibitory role for postnatal sensory and cerebellar granule cell neurons (Moreau-Fauvarque, et al. 2003). The second study used stripe assays to provide evidence for protein synthesis contributing to the repellant response of embryonic spinal motor neurons to stripes of Sema3F (Nedelec, et al. 2012).

Microcontact printing

This technology represents an evolution of the stripe assay. While the basic idea is the same, there is substantially more flexibility in the spatial patterns that can be produced, both in terms of resolution and shape. In μ CP, stamps with micrometer-scale patterned surfaces are used for transferring compounds to a cell culture surface (Figure 48B). Polydimethylsiloxane (PDMS) is the most commonly used material to fabricate these stamps, because it can be easily molded using a master and it results in a polymer that provides a close conformal contact between the stamp and the surface. The stamp is subsequently inked in a solution that is imprinted on the surface. Although several low-cost and rapid alternatives have been proposed (Branham, et al. 2002; Costantino, et al. 2005; Kaigala, et al. 2007; Tan, et al. 2001), soft lithography still usually relies on the use of photolithography to generate the master. Once the master is available, the subsequent procedures can generally be performed outside a clean room. Excellent recent technical and applications reviews (Feng, et al. 2004; Perl, et al. 2009; Quist, et al. 2005), and also exhaustive protocols (Qin, et al. 2010) are available.

Initial studies with neurons showed that μ CP could be used to promote axon extension along intricate patterns (Kam, et al. 2001; Leng, et al. 2004; Oliva, et al. 2003; Wheeler, et al. 1999) that typically involved printing combinations of laminin and poly-d-lysine (PDL). An intriguing study examined synapse formation between axons and neurites using a mix of ECM molecules that was patterned as a grid on a polystyrene surface (Vogt, et al. 2005). Rat embryonic cortical neurons following 12 days *in vitro* were analyzed by double and triple patch clamp measurements with cells on neighboring grid nodes. Cell-to-cell contacts appeared to be reduced by a factor 3 in the grid pattern as compared to on homogeneous substrates, but the rate at which two cells form a contact remained the same. Cell pairs that were not synaptically coupled did not avoid contact and overlapped to a similar extent as coupled pairs. This provided evidence that recognition between pre and postsynaptic cells is required for the establishment of a

synaptic contact, which was supported by the observation of significant enrichment of reciprocal contacts between excitatory and inhibitory neurons.

Investigating axon guidance by repellent cues, μ CP was used to generate a pattern where the spatial density of small dots or lines was varied to generate a global protein gradient (von Philipsborn, et al. 2006b). Patterns of ephrin-A were fabricated to study how neurons decide where to stop in a gradient of a repellent molecule. As opposed to nasal retinal RGC axons, temporal axons invaded the patterns but only advanced a certain distance before they stopped. Interestingly, the position of this stop zone in the pattern could be changed by varying the slope of the pattern and it was found that high slopes caused neurons to stop earlier, at a point in the gradient containing a relatively lower concentration of protein. This behavior was also observed when stamps were inked with different concentrations of proteins, the stop zone advanced deeper into the patterns of lower concentration. This suggests that neurons somehow manage to sum the amount of protein on the pattern for determining when to arrest extension. A notable limitation of μ CP is that while it is possible to change the size, dot concentration and density of patterned elements, the method does not provide a straightforward means to change the local concentration of protein within the pattern stamped onto the substrate.

More recently and using a similar approach, but employing gradients of combinations of laminin and poly-L-lysine, rat cortical neurons were found to extend processes up the gradients, but the neurites were significantly longer with increasing concentration of protein (Fricke, et al. 2011). Gradients with lower slopes reduced the difference in directional growth. Changing the width of the printed protein spots did not result in statistically significant differences. When exclusively axons, and not other neurites, were considered, a different pattern of spot size and slope was the most attractive, guiding 84% of the axons, consistent with axons and dendrites interpreting spatial cues differently.

Microfluidics

Microfluidic devices to study the response of neurons challenged with molecular gradients are a compelling option for understanding axon guidance *in vitro*. These techniques have the capacity for seamless integration of long-term culture with highly controlled measurements and chemical delivery. They can create substrate bound protein gradients of high

dynamic range and they are unique in readily providing for precise control of timing. Furthermore, the cellular microenvironment can be changed during the experiment and it is possible to generate temporal concentration gradients of soluble proteins, such as waveforms or pulses. The most widely used approach to microfluidics is soft lithography, in which a polymer (often PDMS) is poured onto a silicon mold featuring channel and reservoir geometries, and is then cured and demolded. PDMS is transparent from ultraviolet to the near infrared, biocompatible, and non-toxic, which makes it ideal for cell culture, but natural materials such as collagen and other hydrogels have also been utilized in microfluidic devices (Eddington and Beebe 2004; Haessler, et al. 2009). Microfluidic devices may be passive, or flow can be driven by external pumps or capillary action, and their use for cell culture systems has been thoroughly reviewed (Gross, et al. 2007; Kim, et al. 2010; Taylor and Jeon 2010).

The serpentine premixer is an example of a microfluidic device that relies on both flow and diffusion to produce sophisticated concentration gradients (Jeon, et al. 2000). It typically consists of two inlets for solutions that will repeatedly mix and divide in serpentine channels (Figure 48C). Detailed protocols for their fabrication (Taylor, et al. 2006) and review articles (Kim, et al. 2012) are readily available.

In initial applications to studying axon guidance, the serpentine mixer was used to fabricate substrate bound gradients of laminin by allowing the protein to adsorb to the chamber walls (Dertinger, et al. 2002). Although the absolute concentration of bound protein was not determined in this study, the relative steepness of the various gradients was measured. It was observed that laminin alone was sufficient to promote directed growth of neurites of rat hippocampal neurons when they were challenged with a steep gradient.

A more systematic follow-up study challenged rat dorsal root ganglion (DRG) neurons with multiple-component gradients of laminin-1, BSA as a neutral control, and inhibitory CSPG (Li, et al. 2008). Gradients of all three molecules rendered the expected guidance effects when presented to cultured cells one by one. This study also assessed the influence of opposed gradients of laminin and CSPG, and found that they resulted in somewhat stronger guidance, suggesting a synergistic effect that promoted axon turning. Consistent with this, parallel gradients of laminin and CSPG neutralized guidance. The authors also provided evidence that the effect of single-component gradients depended on both slope and absolute concentration.

Microfluidics has also been used to demonstrate that linear gradients of soluble BDNF promoted axon turning toward decreasing concentrations of protein, in embryonic *Xenopus* spinal neurons (Joanne Wang, et al. 2008b). In this study, neurons responded to the gradient's slope, rather than the absolute concentration of protein. In addition, more sophisticated gradient profiles were achieved by increasing the complexity of the mixer. In particular, attractive gradients of substrate-bound laminin combined with a repellent gradient of soluble BDNF could be shown to act synergistically, while pointing these proteins gradients in opposite directions yielded random directional growth. Nevertheless, the synergy depended on the concentration of the cues presented.

Microfluidic networks have also been used as a way to ink proteins on μ CP stamps. Using a serpentine mixer, where one of the walls consisted of a solid slab made of PDMS, the microfluidic network was incubated allowing physical adsorption of the proteins in the channels onto the PDMS surface. This surface was then rinsed and used as a stamp to transfer the adhered proteins. The parallel channels were filled with solutions of increasing concentrations of ephrin-A5 to analyze the response of chick embryonic RGC axons (Lang, et al. 2008). Concentration gradients of different slopes were tested and temporal axons were found to extend longer in gradients with shallow slopes, consistent with what had been found on dotted substrates (von Philipsborn, et al. 2006b). Nasal axons were not found to respond to these gradients, either when dotted, or to protein lanes made using microfluidic networks, in contrast to what had been observed using the stripe assay (Monschau, et al. 1997), illustrating the challenge of interpreting findings obtained using different *in vitro* assays.

A similar approach was used to covalently bind BDNF and netrin-1 to epoxy-coated glass substrates in a graded fashion (Mai, et al. 2009). Microfluidic channels were made in an agarose stamp, which was then pressed against a glass cell culture surface, and the channels filled with increasing concentrations of the proteins. Diffusion out of the channels through the hydrogel rendered continuous gradients of protein bound to the substrate once the agarose slab was removed. Embryonic rat hippocampal neurons grown on these netrin-1 gradients exhibited a preference to initiate and turn toward higher concentrations protein, as had been demonstrated for gradients of netrin-1 applied in solution (Barallobre, et al. 2000). Using this method, no significant changes were detected with respect to the absolute concentration of netrin-1 or the

gradient slope. In contrast, gradients of BDNF induced different responses from neurons growing on regions of the pattern composed of high versus low concentration, since axons exhibited a strong tendency to turn towards areas of mid-level concentration. Furthermore, this response could be switched between attraction and repulsion by manipulating the concentration of intracellular cAMP in the neurons.

Finally, a microfluidic device that generated gradients with negligible flow was used to probe the effect of netrin-1 on mammalian cortical neurons (Bhattacharjee, et al. 2010b). This system, allowing a high-throughput analysis, illustrated the heterogeneity of cell responses to gradients. A majority of cells extended axons that turned towards higher concentrations of netrin-1. Netrin-1 also increased the rate of axon extension, and the direction of axonal growth was assessed as a function of the area of the growth cone exposed to the gradient.

Laser-assisted patterning

Lasers have been used to fabricate functionalized cell culture platforms by either crosslinking small molecules or proteins to a surface, or by inactivating proteins that are already substrate-bound (Adams, et al. 2005; Belisle, et al. 2008b; Heinz, et al. 2011; Herbert, et al. 1997; Hypolite, et al. 1997; Scott, et al. 2012b). In general, these technologies allow near-diffraction-limited resolution and, since the patterns are not limited by diffusion or mechanical constraints, the protein arrangements can be made of arbitrary forms and across a wide dynamic range of concentration. For fabrication, either a laser scans the surface with varying intensity and dwell time (Belisle, et al. 2008b; Scott, et al. 2012b), or an illumination pattern is generated using a mask (Azioune, et al. 2009; Holden and Cremer 2003) or via optical image formation (Belisle, et al. 2009; Nielson, et al. 2009) (Figure 48D).

Using these techniques, surface-bound laminin, and also a gradient of a short peptide fragment of laminin-1 was demonstrated to be sufficient to direct axon growth (19-mer peptide containing the sequence IKVAV) (Adams, et al. 2005). Utilizing a Cd/He UV laser and the peptide conjugated to a benzophenone as a crosslinker, gradients were fabricated by moving the laser focus along the surface and changing the scan velocity. Embryonic chick DRG axons were then used to study the dynamics of axon elongation on gradients with low and high slopes. These

investigators provided evidence that the growth rate of axons slowed on first encounter with the patterned substrate, but then resumed once the axon became aligned up the gradient.

With a similar approach, but replacing gas by lower-cost and more versatile diode lasers, and using readily available chemical reagents, such as biotin and antibodies conjugated to fluorescent dyes as crosslinkers, the same type of gradients can be produced (Belisle, et al. 2008b). Gradients of full-length laminin-1 were shown to influence the direction of initial neuritogenesis, but not guidance using the RGC5 neuronal cell line (Belisle, et al. 2012) in a study that implemented a large-scale image analysis algorithm to significantly increase the number of neurons examined.

A similar patterning method was used (Wissner-Gross, et al. 2011b) to compare several mathematical models that describe neurite outgrowth and their differentiation into axons. Using thin lanes of PDL on which single rat hippocampal neurons were attached, and measuring the growth rate of neurites extending in opposite direction from the same soma, they compared averaged length, velocity and acceleration for 18 hours in culture. Among the different theoretical models tested, none could reproduce all of the aspects of neurite outgrowth documented in culture, but the systematic analysis carried out illustrated the advantages of each model to describe the process.

The application of a two-photon absorption approach significantly accelerated this technology and was used to show that a series of aligned triangular shapes of PDL was sufficient to promote directional growth from base to apex (Scott, et al. 2012b). This polarization depended on the size of the triangles; small triangles ($\sim 10\mu\text{m}$) induced an asymmetric growth towards the apex, but neurons growing on larger triangles ($>50\mu\text{m}$) extended their axons equally in both directions. Embryonic rat hippocampal neurons extended longer neurites on patterns of low concentration PDL and live cell imaging revealed growth that stalled at the triangle borders, but in the backwards direction only. In this study, the authors showed that exciting the sample with a femtosecond laser speeds up significantly the fabrication process, but besides the increased cost of the equipment needed, this new approach requires very a precise control of the axial position of the focal volume and optical modulators to accurately vary the protein concentration on the surface.

Patterning 3D hydrogels

Experiments utilizing 2D cell cultures have provided the basis for much of our current interpretation of biological phenomena. Nevertheless, cellular behavior can be different when comparing 2D cell culture surfaces with native 3D tissues (Engler, et al. 2006). As a consequence, biologists and bioengineers alike are actively investigating 3D tissue-engineered scaffolds to better represent native cellular environments in cell culture (Baker and Chen 2012; Horn-Ranney, et al. 2012). Producing such scaffolds containing a 3D gradient supported by adequate mechanical and chemical characteristics for neuronal cell survival and axon extension represent perhaps the ultimate *in vitro* guidance assay, although success in generating such cultures will impose several major additional challenges in terms of imaging and quantification. Several types of matrices and gradients have been developed with tissue regeneration in mind (Dodla and Bellamkonda 2008; Gollavelli and Ling 2012; Khaing and Schmidt 2012), nevertheless, only a few studies have focused on using such methods to study cellular mechanisms.

Extracellular scaffolds, such as collagen type I, can be imprinted by dripping droplets of protein solutions in specific locations with a nanoliter precision pump and a motorized stage (Rosoff, et al. 2004) (Figure 48E). Using this technique, the number of droplets per area and their concentration define the geometry of the gradient. Horizontal diffusion accounts for the continuous shape of the gradient while vertical diffusion provides a graded distribution in the third dimension. This method was employed to confirm theoretical models of gradient sensing by growth cones, using NGF as a guidance cue for dorsal root ganglion explants (Mortimer, et al. 2009). The model utilized considers the stochastic interactions of ligands and receptors as a fundamental constraint, so as to establish how the mean concentration and slope of gradients affect growth cone decisions. By measuring the asymmetric growth of neurites extending from early postnatal rat DRG explants the authors provided evidence supporting a Bayesian model and illustrated an extreme sensitivity to gradients as low as 0.24% of 2 pM NGF. It is notable to consider that a 0.3% change over 10 μm at 2 pM corresponds to an absolute change of ≈ 1 molecule per millimeter per 1,000 μm^3 (approximately the volume of a growth cone). This same 3D printing technology was used to demonstrate that the outgrowth response to gradients of NGF was dependent on the rostrocaudal origin of the DRG cells (Vetter, et al. 2010).

In an interesting study, such patterns were used to challenge the idea that growth cones generate immediate turns when responding to a gradient. Instead, the authors propose that a modulation of growth rate contributes to axon turning (Mortimer, et al. 2010). Using an automated method to identify growth cones exiting from DRG explants they studied axon turning and asymmetric growth (Mortimer, et al. 2009), and identified relatively weak turning responses at the axons tips in samples where neurite growth is strongly biased up the gradient. The authors concluded that the growth process does not necessarily involve a growth cone making a comparison in the extent of ligand-receptor binding between its sides and immediately turning as a result. They propose that the growth cone makes a comparison along its front-to-back axis and then modulates its speed; at each time step the growth cone also turns slightly, but the direction of this turn is hypothesized to be random and unrelated to the direction of the gradient.

Finally, a microfluidic network was used to produce 3D gradients by injecting ice-cold liquid collagen in a chamber and connecting channels to subsequently deliver guidance cues to only one side of the chamber (Kothapalli, et al. 2011a). In this system, both diffusion and flow account for the shape of the gradient. This system was tested with netrin-1 diffusing from three different sources as a model of chemoattraction, and with slit-2 as a model of chemorepulsion applied to neurons derived from hippocampus or dorsal root ganglia. Different gradient concentrations were tested, revealing responses across a dynamic ranges of concentrations, with some contrast to what has been concluded previously using substrate bound 2D patterns (Mai, et al. 2009).

Conclusions

Substrate engineering represents a unique opportunity to probe how extending axons interpret the spatial cues in their local environment. These technologies allow exquisite precision in the presentation of the individual molecular components that are essential to this process. Protein patterns fabricated with subcellular resolution on increasingly biomimetic substrates together with high-content studies can substantially increase sample sizes and improve the statistical reliability of *in vitro* guidance experiments. Engineered substrates have allowed the identification and functional characterization of new molecules that regulate axon guidance, the investigation of unknown synergistic molecular interactions and the description

of several signaling pathways. They have been used in a wide variety of neuronal tissues and species, and at different developmental stages to perform a systematic characterization of growth cone navigation along protein patterns (Tableau VIII). The field has advanced substantially since the 1980s and exciting applications are expected using the novel substrate engineering techniques that have recently become available.

Beyond the quantitative descriptions of the response of growth cones to gradients that have been achieved, major opportunities are now open to investigate multicomponent substrates. It is commonly accepted that extending axons break down their journeys into smaller trips, reaching intermediate targets before their final destination. An exciting avenue for future studies involves reconstructing the complex spatial distribution of multiple cues in vitro using engineered substrates. Such multicomponent substrates will provide unique tools for obtaining a greater understanding of the spatial and temporal mechanisms that underlie the formation of neural circuits. Studying the signaling mechanisms that regulate this process is essential, but has proven to be technically challenging when limited by traditional approaches. They represent, from our personal perspective, a research direction where lab-on-a-chip neuroscience has the potential of achieving breakthrough discoveries.

The field has advanced substantially since the 1980s and exciting applications are expected using the novel substrate engineering techniques that have recently become available. Furthermore, during the last decade a large number of interdisciplinary teams have been created, as well as the first graduate programs in biophotonics and neuroengineering. This will surely lead to a new generation of investigators that will drive neuroscience research with the unique perspective of cross-disciplinary backgrounds.

Methods	Type of gradients	Guidance cues	Models	References
Stripe assay	surface-bound, discontinuous	SRF, ephrin-A5, ephA, ephA6, LAMP, CSGP, sema3f, sema4D	hippocampal neurons, VNO, cortical neurons, RGCs, spinal motor neurons, cerebellar granule cells	(Knoll, et al. 2006; Knoll, et al. 2001; Mann, et al. 1998; Monnier, et al. 2003; Moreau-Fauvarque, et al. 2003; Nedelec, et al. 2012; Savaskan, et al. 1999)
Microcontact printing	surface-bound, dotted and continuous	laminin-1, PDL/PLL, ECM, ephrin-As	DRG cells, hippocampal neurons, cortical neurons, RGCs	(Fricke, et al. 2011; Kam, et al. 2001; Leng, et al. 2004; Oliva, et al. 2003; Vogt, et al. 2005; von Philipsborn, et al. 2006a; Wheeler, et al. 1999)
Microfluidics	soluble and surface-bound, continuous	laminin-1, CSPG, BDNF, ephrin-A5	DRG cells, spinal motor neurons, RGCs, hippocampal neurons, cortical neurons	(Bhattacharjee, et al. 2010a; Dertinger, et al. 2002; Filep 2013; Joanne Wang, et al. 2008a; Lang, et al. 2008; Li, et al. 2008; Mai, et al. 2009)
Laser-assisted patterning	surface-bound, dotted and continuous	laminin-1, PDL	DRG cells, RGCs, hippocampal neurons	(Adams, et al. 2005; Belisle, et al. 2008a; Belisle, et al. 2012; Scott, et al. 2012a; Wissner-Gross, et al. 2011a)
3D hydrogels	continuous	NGF, netrin-1, slit-2	DRG cells	(Kothapalli, et al. 2011b; Mortimer, et al. 2009; Mortimer, et al. 2010; Vetter, et al. 2010)

Tableau VIII. Engineered culture substrate methods to study axon guidance

Acknowledgments

JR was supported by funds from the NSERC-CREATE Training Program in NeuroEngineering and an FQRS doctoral scholarship. TEK holds an FQRS Chercheur National award and is a Killam Foundation Scholar. SC holds an FQRS Chercheur Junior 1 award.

Annexe 2 : Algorithme de suivi des trajectoires, « Bioinformatics »

Avant-propos

On calcule communément les trajectoires de particules individuelles (« Single Particle Tracking ») grâce à un algorithme de recherche des plus proches voisins (« Nearest-neighbor approach »). Cette méthode se base sur la minimisation de la distance globale parcourue par tous les objets d'un système. La performance de cet algorithme dépend du réglage de paramètres propres au système étudié. Cet article présente une modification d'un algorithme standard, adaptée aux systèmes où la distribution des particules est inhomogène.

C'est un problème dans l'analyse de mes données qui est à l'origine de cet article. En effet, comme les neutrophiles se déplacent d'une zone très dense vers une zone vierge, je n'arrivais pas à établir le paramètre optimal de rayon de recherche des voisins (« Maximum Displacement » - mD) pour l'ensemble du système. J'obtenais des trajectoires tronquées, de fausses trajectoires ou encore, le temps de traitement informatique était impraticable. L'algorithme présentée dans cet article a grandement amélioré la performance du suivi des trajectoires de mes essais de migration.

J'ai contribué à cet article par des sessions de brainstorming avec Javier Mazzaferri et Santiago Costantino. J'ai aussi généré les données biologiques nécessaires aux tests de performances et rédigé la section portant sur cette méthode. Javier Mazzaferri et Santiago Costantino ont conçu l'algorithme et rédigé l'article. Stéphane Lefrancois a participé à la rédaction. Le code de l'algorithme proposée est disponible gratuitement à la communauté scientifique sous une licence publique générale GNU.

Adaptive settings for the nearest-neighbor particle tracking algorithm

Javier Mazzaferri, Joannie Roy, Stephane Lefrancois and Santiago Costantino

Received on May 5, 2014; revised on October 29, 2014; accepted on November 25, 2014

Associate Editor: Robert F. Murphy

Abstract

Background: The performance of the Single Particle Tracking (SPT) nearest-neighbor algorithm is determined by parameters that need to be set according to the characteristics of the time series under study. Inhomogeneous systems, where these characteristics fluctuate spatially, are poorly tracked when parameters are set globally.

Results: We present a novel SPT approach that adapts the well-known nearest-neighbor tracking algorithm to the local density of particles to overcome the problems of inhomogeneity.

Conclusions: We demonstrate the performance improvement provided by the proposed method using numerical simulations and experimental data and compare its performance with state of the art SPT algorithms.

Availability and implementation: The algorithms proposed here, are released under the GNU General Public License and are freely available on the web at <http://sourceforge.net/p/adaptivespt>.

Supplementary information: Supplementary data are available at *Bioinformatics* online.

1. Introduction

Single particle tracking (SPT) has become an essential tool to characterize movement in live cell imaging experiments (Meijering, et al. 2012). Typical applications span the dynamics of single molecules within the cell membrane (Weigel, et al. 2011), cell migration (Suraneni, et al. 2012), and intracellular trafficking (Akita, et al. 2010; Mazzaferri, et al. 2013). SPT methods extract the individual trajectories of objects registered in time-lapse images and provide information about both their individual and collective behavior. Although several studies track objects manually, the big leap for exploiting this technique has been brought by automatic

multiple-tracking algorithms, because they can process large number of objects simultaneously (Kalaidzidis 2009).

The vast majority of the implementations separate particle *detection*, i.e. the identification and location of particles in each image of the time series, from *tracking*. The latter assigns particle positions that result from *detection*, to individual trajectories. The simplest *tracking* approach, often named *nearest neighbors*, is based on minimizing the distance travelled globally by all particles. That is, object locations that are close enough in space and time are assigned to the same trajectory. However, the sole criterion of proximity is not enough under challenging experimental conditions. Tracking densely packed objects, and particles that merge, split, or blink, requires additional information to uncover the real underlying tracks. In recent years, several methods have been proposed to address several of these shortcomings, which have been reviewed in detail (Kalaidzidis 2009; Meijering, et al. 2012). Typically, these methods employ sophisticated image processing and statistical tools, as well as *a priori* knowledge about the systems, to overcome clutter, noisy detection and eventual particle disappearance. The downside of methods that assume specific dynamical models is that they can bias the tracking results if they are used early on systems where the dynamics is still unknown (Supplementary note 5). In such cases a more secure procedure is to start the analysis with a conceptually simple tracking approach, such as the nearest-neighbor algorithm.

Regardless of how complex the method, its performance relies invariably on tuning accurately a set of parameters, which depend on the experimental details of the system (Chenouard, et al. 2014). If the features of the system fluctuate spatially it is unlikely that a unique set of parameters are optimal across the entire image. Systems such as, neutrophil migration assays, intracellular trafficking of vesicles, particles diffusing in media with heterogeneous viscosity, and tracking of receptors unevenly distributed on the cell membrane are examples where this problem is particularly important (Manley, et al. 2008; Valentine, et al. 2001). Typically, this is partially addressed by limiting the analysis to small regions of interest, where conditions are approximately homogeneous. However, if trajectories are long, this workaround cuts tracks and biases the description of the system's dynamics.

In this work, we propose a new SPT method for inhomogeneous systems that adapts automatically to the local density of particles, based on the popular *nearest-neighbor* tracking

algorithm. One of the most cited and used nearest-neighbor algorithms was proposed by Crocker and Grier (C&G) (Crocker and Grier 1996), and has a simple code and free open source implementations in IDL, Matlab, Python and ImageJ (Bricard, et al. 2013; Lund and Wustner 2013; Manley, et al. 2008; Theves, et al. 2013). Despite its simplicity, a method based on this algorithm (Celler, et al. 2013) has shown to render a good performance in a recent study that makes a widespread and quantitative comparison of SPT techniques (Chenouard, et al. 2014).

Nearest-neighbor algorithms minimize the global displacement of the particles, and thus need to consider all possible combinations of particle positions from one frame to the following, which can be computationally too expensive. Therefore, it is necessary to introduce a parameter called maximum displacement (mD), which represents the largest distance that a particle can move from one frame to the next one, to discard unlikely bonds and reduce the computation time. If this parameter is not carefully adjusted according to particles' speed and their density, either the trajectories are interrupted or the computation time is prohibitive. Therefore, in systems where particle density is inhomogeneous, there is no global value of mD that can be optimal everywhere. The method we propose is especially well suited for this kind of problem. We perform a systematic analysis of the problem, based on numerical simulations, as well as a thorough comparison of the proposed method with the standard nearest-neighbor algorithm. We finally demonstrate the advantage of applying the adaptive method to the classic under-agarose neutrophils migration assay (Nelson, et al. 1975; Sackmann, et al. 2012).

2. Methods

2.1 Tracking algorithm and mD

Tracking algorithms identify which locations at frame t_i and t_{i+1} correspond to the same particle. In *Nearest-neighbor* methods, this correspondence is established by creating unique bonds between particle locations based on proximity. These algorithms consider all possible assignments and choose the combination that yields the minimal total displacement for all particles. However, if each frame holds P particle positions, the network of bonds has $O(P!)$ possible combinations, which makes the solution impractical even for small values of P (Figure 49A).

As a workaround, nearest-neighbor methods limit the possible bonds to only those that are shorter than the preset parameter “maximum displacement” (mD , Figure 49B, dashed circle). In this way, the problem is reduced to solve a set of smaller sub-networks, where the number of combinations reduces to $O(P \ln(P))$, that has a significantly lower computational cost (Crocker and Grier 1996).

However, mD has to be set wisely. It has to be small enough to discard false bonds, but large enough to detect all bonds that represent real particle displacements. It has been suggested that the optimal magnitude of mD (Crocker and Grier 1996) should satisfy:

$$\delta < mD < \frac{D}{2}, (1)$$

where δ is the typical displacement of the particles during one frame (particle velocity times inter-frame interval), and D is the typical inter-particle distance. The first inequality ensures that real particle steps are detected, and the second inequality discards spurious bonds to nearby particles.

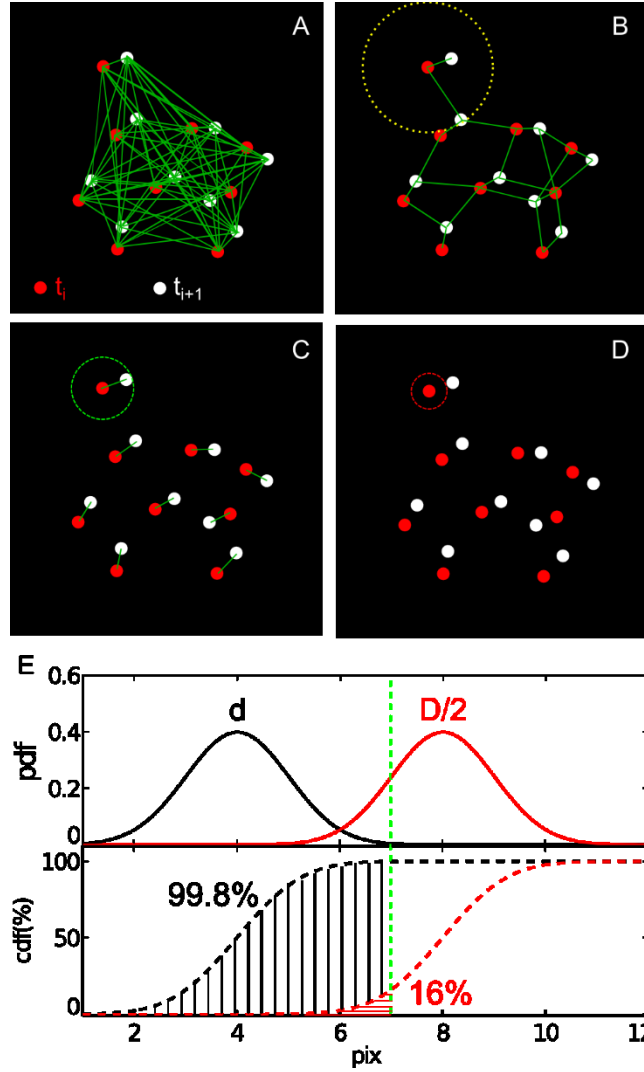


Figure 49. Nearest-neighbor bond assignment

(A) The assignment of exclusive bonds between P locations at consecutive frames is computationally expensive because there are $O(P!)$ possible combinations to consider. (B) Using the search radius mD , the algorithm only needs to consider bonds that are shorter than mD , thus significantly reducing the number of combinations to $O(P \ln(P))$. (C) The value of mD can eventually be reduced to improve further the computation time. (D) If mD is smaller than the typical one-frame displacement of the particles, most bonds are discarded and the trajectories are interrupted. (E) *Top*: schematic probability density functions (pdf) for δ and $D/2$. *Bottom*: cumulative density functions (cdf) corresponding to the distributions above. Shaded regions below each distribution illustrates the trade off made when setting a value for mD (vertical dashed line). In this example, due to the overlap between distributions, for $mD = 7$ pix, 99.8% of real bonds are detected (vertical lines shadow) at the cost of also detecting 16% of spurious bonds to neighboring particles (horizontal lines shadow).

In practice, particle speeds (δ) are typically unknown a priori and it is customary to set mD as large as possible to minimize the risk of missing fast displacements. Although this strategy do

not discard spurious bonds, while $\delta < D$ the algorithm will make the right connections. The real problem is that increasing mD boosts the number of candidate bond combinations, and computation time becomes too long. Figure 49A-D depicts the effect of different mD choices on the configuration of candidate bonds: while an overestimated mD yields an excessive number of bond combinations (Figure 49A), when mD is too small trajectories are interrupted because real particle displacements are excluded (Figure 49D). In summary, mD is typically chosen as large as possible while computation time remains practical.

Additionally, both δ and D fluctuate from particle to particle and in time, and they are distributed as schematized in Figure 49E. If the δ and D distributions are well separated, a value of mD between them is enough, but when they overlap a trade-off is required (see Figure 49E and F). When the overlap of these distributions is extensive, the system is ill-conditioned because the computationally affordable value of mD is not large enough for all δ , and some trajectories will necessarily be interrupted.

Specifically, the systems where D is spatially inhomogeneous are challenging for *tracking* because dense regions broaden and shift the $D/2$ distribution to the left, increasing the overlap and hampering the performance. Although this limitation originates from dense regions, the impact on performance is ubiquitous, because mD is chosen globally.

2.2 Locally adaptive SPT

Instead of using a global value of mD to determine the set of candidate bonds, we propose to build a function $mD(x,y,t)$, that adapts to local space and time fluctuations of the nearest-neighbor distance $D(x,y,t)$. In this way we restrict the length of candidate bonds mostly within crowded regions, where it is more necessary, but allow particles in low density regions to make longer bonds.

In order to satisfy the needs of high-content studies, we propose an algorithm that computes $mD(x,y,t)$ from previously detected particle locations $\{(x_i, y_i, t_i)\}$. In order to keep computation time practical, the algorithm chooses $mD(x,y,t)$ to render a number of candidate bonds combinations (*CBC*) that the computer system can process in viable time.

We set $mD_i = mD(x_i, y_i, t_i)$ at each particle location to be proportional to the distance to the nearest neighbor particle $D_i = D(x_i, y_i, t_i)$ (see Figure 50A and B). However, fast fluctuations of D yield unnecessary oscillations of mD , that can be avoided by replacing D_i with an averaged version

$$D_\phi(x, y) = \langle \{D_i / (x_i, y_i) \in B(x, y, \phi) \wedge \forall t_i\} \rangle$$

where $B(x, y, \phi)$ is a circular neighborhood centered at (x, y) of diameter ϕ . The operator $\langle . \rangle$ indicates set average.

The number CBC for a given $mD(x, y, t)$ depends, not only on the number of bonds, but also on how they intertwine with one another in sub-networks (Figure 50C). Since the tracking algorithm solves these sub-networks sequentially, what ultimately limits CBC is the size of the largest sub-network.

Since the quantity and structure of the sub-networks are hard to predict, we approached the selection of $mD(x, y, t)$ using an heuristic and exhaustive method. We introduce a multiplicative factor α to scale D_ϕ at each frame, so that

$$mD(x, y, t) = \alpha(t) D_\phi(x, y)$$

Then, for each pair of consecutive frames we search iteratively the value of α for which the largest sub-network has the size of CBC . For an Intel Core i7-4770K processor running Matlab under linux OS, $CBC = 5 \times 10^4$ ensures that they can be processed in a few minutes, but this is a parameter that has to be set according to the available computing power.

A bisection algorithm is used to choose the value of α that renders a number of combinations as near as possible to predefined tolerance. For each candidate value of α , the whole set of candidate bonds is restricted to include only those shorter than mD , and all uniquely determined one-to-one bonds are discarded. Then, remaining bonds that are connected to each other by sharing a starting or ending position, are flagged as belonging to the same sub-network (Figure 50C). We estimate the number of combinations for each sub-network by multiplying the number of candidate bonds for each particle in the sub-network as:

$$\prod_{i=1}^P \#(\{b_{ij}\})$$

where P is the number of particle positions that belong to the sub-network, $\{b_{ij}\}$ is the set of candidate bonds starting in position i and ending in j , and $\#(.)$ denotes set cardinality.

To always ensure track termination we constrain mD so that it never exceeds the parameter mD_{max} that is determined by visual inspection of data.

At the end, we use $mD(x,y,t)$ to reduce the set of candidate bonds with which the C&G algorithm builds the trajectories.

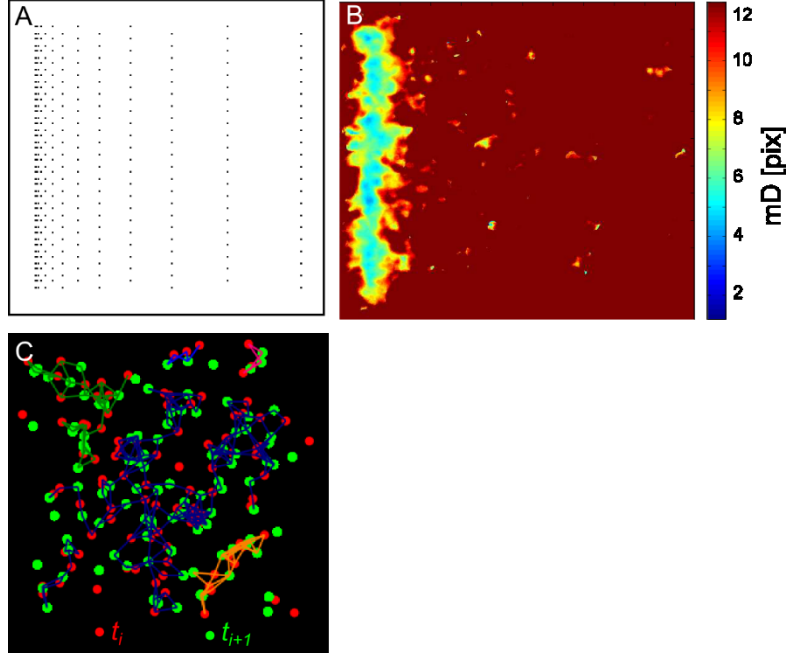


Figure 50. **Particle distribution and sub-network**

(A) Unevenly distributed particles. (B) Color coded example of function mD for particles in (A), $\alpha=1$, and $mD_{max} = 12$ pixels. (C) Bond sub-networks for a specific mD function at two consecutive frames. Lines of the same color denote bonds in the same sub-network. Unconnected particle positions are due to either bonds longer than mD_i or trivial one-to-one bonds.

2.3 Performance assessment of tracking

In order to evaluate quantitatively the performance of tracking algorithms we compared their outcomes against a set of numerically simulated trajectories $T_k = \{(x_t^k, y_t^k, t), t = 1 \dots F_k\}$, which we consider ground-truth (GT). For each test, a set $\{T_k, k = 1 \dots N\}$ of N trajectories is produced, where each one is a sequence of particle locations along F_k time points. The initial coordinates for all trajectories are homogeneously distributed in a hexagonal lattice with inter-

particle distance D (Figure 51A). Each trajectory evolves with normally distributed step sizes (mean value $\langle \delta \rangle$ and standard deviation $\sigma \delta$), during F_{\max} frames or until it exceeds the image boundaries. Also, the direction of movement changes from frame to frame a certain amount θ that is uniformly distributed between 0 and 2π . Pseudo random number generation is done with the Matlab (R2013a) implementation of Mersenne Twister algorithm, using specific initialization seeds in order to make the simulations repeatable.

All the locations $\{(x, y, t/x, y, t) \in T_k \wedge T_k \in G\}$, without repetitions, are processed with the tracking algorithm under analysis, rendering the estimated trajectories $E = \{T_q, q = 1 \dots M\}$. Since our study focuses only on the *tracking* step of SPT, we concentrate on evaluating the performance of making bonds between locations, and not in the *detection* of objects. To this end, we represent the trajectories in G and E as a sequence of bonds $T_k = \{b_{ij}^k\}$, where b_{ij} represents the bond between locations (x_i^k, y_i^k, i) and (x_j^k, y_j^k, j) .

To characterize the tracking performance at the level of individual bonds we computed the number of them present in the G that are not in E (false negatives), and the number of bonds in E that are not present in the G (false positives). Additionally, to measure the ability to estimate whole trajectories, we computed the average tracked fraction

$$f = \langle |T_q| / |T_k| \rangle \quad (2)$$

where $T_k \in G$, T_q is the longest (in time) and continuous segment in E that matches T_k . Operator $|\cdot|$ denotes duration in frames. Angle brackets indicate average over G . Since our analysis does not involve detection uncertainties, there is no ambiguity determining the matching locations between T_q and T_k .

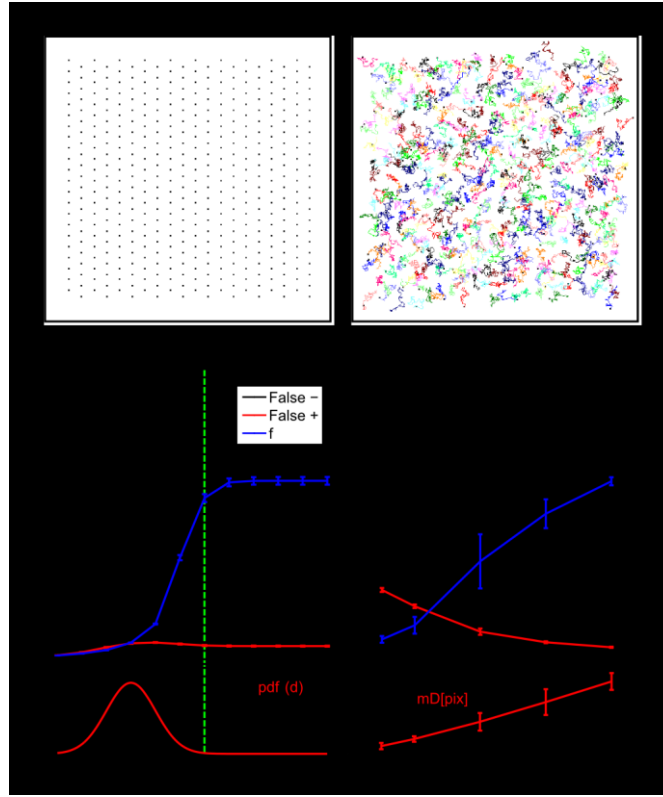


Figure 51. **Performance of nearest-neighbors algorithm**

Performance of nearest-neighbors algorithm vs. mD and inter-particle distance. All trajectories sets G were numerically generated with $N=400$, $F_{max} = 100$ frames, $\langle \delta \rangle = 4$ pixels, $\sigma_\delta = 1$ pixel, and several values of inter-particle distance D . (A) Distribution of particles at $t=0$ for $D=24$ pix. (B) Snapshot trajectories E obtained with C&G algorithm using $mD = 12$ pixels at frame 40 for the same time series of (A). (C) Descriptors of tracking performance on trajectories generated with $D=24$ pixels versus mD used by C&G algorithm (top panel), and probability density function of δ (bottom panel). The green vertical line indicates percentile 99.7% of δ . Error bars indicate the standard deviation for time series generated with seeds 2,4,5,6,7,8,10,12,13, and 14. (D) Descriptors of tracking performance vs. $D/2$ (top panel). Each set of trajectories was tracked with mD computed with the automatic algorithm described in section 2.2 by setting $D_\phi(x,y)$ constant and choosing the minimal α among all frames (bottom panel). Error bars indicate the standard deviation for time series generated with seeds 1 to 10

3. Results and Discussion

3.1 Tracking performance is determined by mD

The tracking performance of nearest-neighbors algorithms is strongly affected by the choice of mD . To explore this, we numerically simulated trajectories of particles with parameters $\langle \delta \rangle = 4$ pix, $\sigma_\delta = 1$ pix, $N = 400$ particles, $F_{max} = 100$ frames, and $D = 24$ pixels

(Figure 51A). We process them with the standard C&G algorithm (Crocker and Grier 1996) implemented in Matlab (Mathworks, Inc.) using several values of mD (Fig. 3B and C). For mD above 7 pix, the performance of the tracking shows a plateau, but below this value the performance decreases: There are more false negatives and the average tracked fraction f gets smaller. This effect can be explained by comparing the value of mD with the particle step distribution (Figure 51C, bottom panel). The value $mD = 7\text{pix}$ represents $\langle\delta\rangle+3\sigma_\delta$, that is greater than 99% percent of particle possible steps, so most of the real bonds are detected and the performance is almost optimal. On the contrary, as mD gets smaller than $\langle\delta\rangle+3\sigma_\delta$, a greater fraction of the particles get out of the search radius and the performance decreases (see also Figure 49E).

In summary, the performance gets better by increasing mD , but this also requires longer computation time because a larger number of linking candidates fall inside the search radius. Additionally, computation time grows when particles get near one another. Therefore the choice of mD is also related to the interparticle distance (eq. 1). To study this, we generated time series, similar to those above, but in this case we varied the interparticle distance D . We performed particle tracking on each time series, computing mD with the algorithm described in Section 2.2 by setting $D_\phi(x,y)$ constant and choosing the minimal α among all frames (Figure 51D, bottom panel). In the top panel of Figure 51D we plotted the performance descriptors versus the inter-particle half distance. The inter-particle distance has a strong impact, not only on the false negatives percentage, but also on the false positive fraction. In fact, as the inter-particle distance gets smaller, mD has to be reduced in order to keep computation time low, what yields an increase of false negatives. Additionally, as particles get too close to each other, the probability of making bonds to nearby trajectories is larger, resulting in more false positives.

In summary, when the particles are densely distributed, two effects limit the tracking performance: higher false negatives (and lower tracked fraction f) produced by smaller values of mD , and higher false positives due to more frequent bonds to nearby particles. The latter is an intrinsic problem of time series where the inter-particle half distance is similar to the typical particle step. Algorithms that use more sophisticated criteria for assigning bonds can improve the performance in these cases (Jaqaman, et al. 2008a; Serge, et al. 2008).

3.2 Tracking performance is low for inhomogeneous distributions of particles

The effects mentioned above are also observed when only part of the image has densely packed particles. In such cases, the regions of high density limit the maximum value of mD , and this has an impact in the performance of the tracking everywhere. To study such systems, we simulated time series in which the particle density varies along the horizontal coordinate x (See Figure 52B-D). We generated such movies by modifying the initial position of trajectories with a gamma transformation applied to x coordinates of all particle positions (Eq. 3, Figure 52A):

$$x' = \left(\frac{(x - x_{min})}{(x_{max} - x_{min})} \right)^\gamma (x_{max} - x_{min}) + x_{min}, \quad (3)$$

where x is the horizontal coordinate of the particles in an homogeneous distribution (Fig.3 A), x_{min} and x_{max} are the minimum and maximum values of x , and x' are the transformed x coordinates of particles. We generated time series with parameters similar to those studied in Section 3.1 for several values of γ .

We tracked each one of them with the standard C&G algorithm and plot the performance descriptors vs. γ in Figure 52E (top, solid lines, and Film 7). For each movie we computed the global value of mD (Figure 52E, bottom) with our automatic algorithm by setting $D_\phi(x,y)$ constant and choosing the minimal α among all frames.

For the homogeneous case ($\gamma=1$) both false negatives and false positives are approximately 3.5% while the mean tracked fraction f is 63%. However, the performance progressively worsens as γ increases because the region on the left of the image becomes crowded with particles, which force the automatic algorithm to chose smaller values of mD (Figure 52E, bottom).

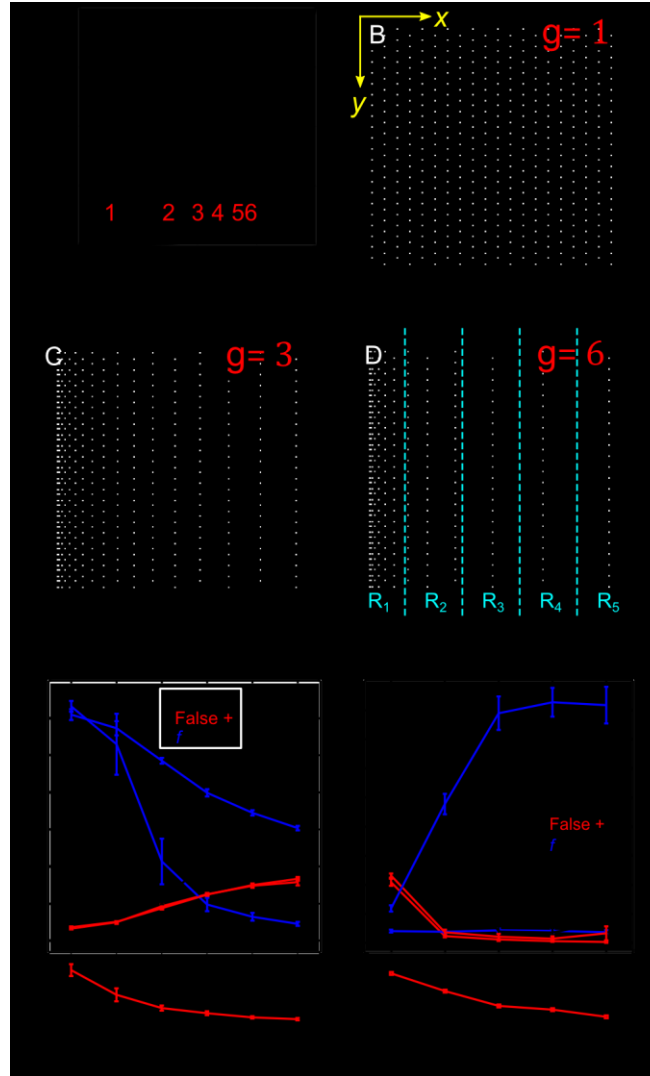


Figure 52. **Tracking performance of spatially inhomogeneous time series.**

All trajectories sets G were numerically generated with $N=400$, $F_{max} = 100$ frames, $\langle \delta \rangle = 4$ pixels, $\sigma_\delta = 1$ pixel, and $D = 24$ pixels. The initial positions of particles were redistributed with eq. 3 for several values of γ . (A) Gamma curves of eq. 3 for $\gamma=1$ to 6. (B) to (D): Initial particle locations for $\gamma=1$, 3, and 6, respectively. (E) Performance descriptors for the standard C&G (full lines) and Adaptive (dashed lines) algorithms as a function of γ (top), and values of mD used for the C&G algorithm computed with the automatic algorithm by setting $D_\phi(x,y)$ constant and choosing the minimal α among all frames (bottom). Error bars indicate the standard deviation for time series generated with seeds 1 to 10. (F) Top: Local tracking performance at regions depicted in (D). Bottom: Number of tracks analyzed in each region.

3.3 Adaptive algorithm improves tracking performance

The decrease of performance observed on inhomogeneous systems (Figure 52E, top panel) can be mostly explained by the small values of mD (Figure 52E, bottom panel) imposed

by the regions of high density of particles. The effect is similar to the one observed in dense systems (Figure 52D) but the tracking in the inhomogeneous system can be improved because the particles located on the right are sparse enough to afford larger mD. We propose using the spatially adaptive approach for optimizing the value of mD locally, according to the local density of particles. To test this idea, the same set of time series processed with the standard algorithm (Figure 52E, solid lines), was processed with the adaptive algorithm described in Section 2.2 (Figure 52E, dashed lines, and Film 8). The parameter ϕ , was set equal to 10 pixels (see Supplementary Note S4).

Although the overall performance is reduced as c increases, it is clearly better than for the standard algorithm. The difference between the two approaches shows mostly in the false negatives fraction and the tracked length, although there is also a slight improvement on the fraction of false positives. This is consistent with the fact that the performance improvement for the adaptive algorithm is mostly due to better matching between mD and the local particle density.

In Figure 52F we plot the performance descriptors for both tracking methods within different spatial regions for inhomogeneous time series with $\gamma = 6$. Essentially, the trajectories studied in Figure 4E, are now analyzed within five intervals of x : $R_1 = [0, 20)$, $R_2 = [20, 40)$, $R_3 = [40, 60)$, $R_4 = [60, 80)$ and $R_5 = [80, 100]$, for values of x expressed in percentage of x_{\max} (Figure 52D). Although in R_1 , the performance improvement is modest because particles are densely packed in R_5 the improvement is dramatic. Due to the ability of adapting the value of mD to the local density, the tracking performance in the sparse regions on the right of the image are not limited by the high density of particles that happens on the left. In this way, the performances are greatly optimized.

In order to test the adaptive algorithm in typical challenging conditions, and to compare its performance with state of the art methods, we used the tools developed for the SPT challenge (Chenouard, et al. 2014). The results, described in Supplementary Note S1, show that the adaptive method, using a simple detection algorithm (Supplementary Note S2), presents a performance that is fairly comparable with state of the art SPT methods. However, these tests are not designed to evaluate performance under inhomogeneous conditions, which is the main advantage of the proposed method. Additionally, we compared the adaptive algorithm with u-

track tracking which has open source code (Jaqaman, et al. 2008b). This analysis, described in Supplementary Note S6 shows that u-track performs very similarly to the adaptive algorithm for systems similar to those in Figure 52E, although it shows a small improvement for very inhomogeneous conditions. However, when particles undergo abruptly long displacements, the adaptive algorithm renders better performance than u-track (Supplementary Notes S5 and S6).

3.4 Adaptive algorithm improves biophysical measurements

Inaccurate particle tracking may produce biased biophysical measures like particle speed and mean square displacement (MSD) (Chenouard, et al. 2014; Sackmann, et al. 2012; Weimann, et al. 2013). According to the performance analysis in Sections 3.2 and 3.3, it is expected that the accuracy of these biophysical measures may also be hampered in inhomogeneous systems.

We analyzed the distribution of one-frame displacements d (instantaneous speed) and MSD curves, since they are biophysical descriptors typically derived from SPT analyzes. We compared the results of analyzing the GT and trajectories estimated with both C&G and the Adaptive algorithm. Because the improvement provided by the adaptive method is mostly within regions where particle density is not extremely high (see Figure 52F), we compared only trajectories placed in the rightmost 80% of the movie (Figure 53A). In Figure 53B, we compare the distributions of d using boxplots. Although the median of δ distributions on both GT and Adaptive trajectories match the parameter $\langle\delta\rangle$ of generated trajectories, the values estimated with C&G are clearly biased towards zero. Similarly, the MSD curve generated from C&G tracking reveals that this method underestimates particle displacement (Figure 53C) in inhomogeneous movies. Also, since most trajectories are interrupted by missing bonds, the obtained trajectories are short, making it impossible to compute the MSD at large time delays (Δt). The linear fits of the MSD curves yield diffusion coefficients of: $D_{GT} = (1.69 \pm 0.002)$, $D_{C\&G} = (0.65 \pm 0.1)$, $D_{adap} = (1.59 \pm 0.04)$, all expressed in $\text{pix}^2/\text{frame}$, that also show the inaccuracy of the global C&G in this case. All these results confirm the problems that arise from using C&G algorithm in inhomogeneous movies with global parameters, and that the method presented here can solve them.

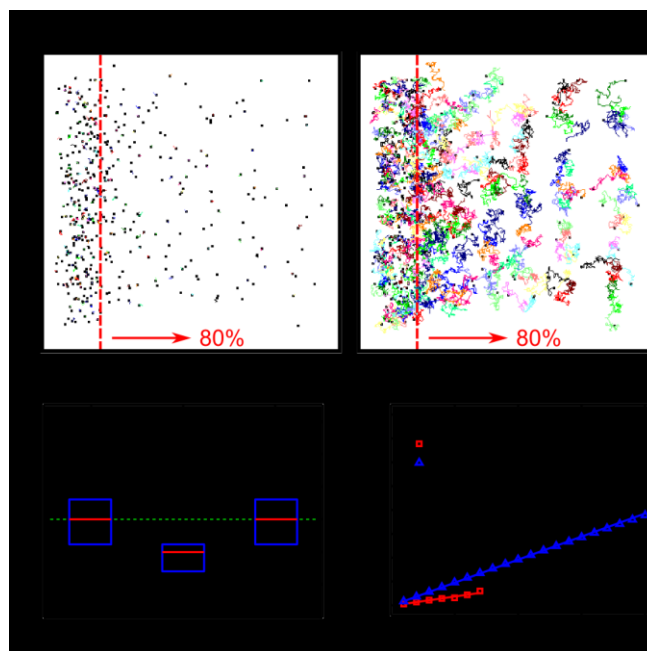


Figure 53. **Performance of biophysical measures**

Ten trajectories sets G were numerically generated (seeds = 1–10) with $n = 400$, $F_{\max} = 100$ frames, $\langle \delta \rangle = 3$ pixels, $\sigma_{\delta} = 1$ pixel, $D = 17$ pixels and $\gamma = 5$. (A) Snapshots of trajectories estimated with C&G and Adaptive algorithms at frame 50 of the same time series. (B) Boxplots of δ for particles placed in the rightmost 80% of the movies, for GT, and trajectories estimated with C&G and Adaptive algorithm. The horizontal dotted line indicates the value of $\langle \delta \rangle$ used to generate the trajectories. (C) MSD curves with corresponding linear fits for the same trajectories analyzed in (B). Error bars for MSD of GT trajectories indicate the SD of squared displacements

3.5 Adaptive algorithm for Neutrophils migration assay

We used the adaptive algorithm to track the movement of neutrophils in the classical under-agarose chemotaxis assay (Nelson, et al. 1975), using the detection algorithm described in supplementary note 3. In this assay, neutrophils migrate by squeezing between a coverslip and a layer of agarose where a diffusing peptide produces a graded concentration of a chemotactic cue. The neutrophils, tagged with a florescent dye, enter the system from the left (Figure 54A) and migrate towards the right, where the peptide concentration increases. The density of cells is remarkably inhomogeneous and they become difficult to track as explained in previous sections. Using the adaptive algorithm, long trajectories are detected despite the high concentration of cells on the left (see Figure 54A, and Film 9). To quantify the improvement of performance obtained with the proposed method, we also tracked the cells with the standard C&G algorithm. We computed the cumulative tracked length (in time) starting from the longer

trajectories, and we plotted it versus the trajectory length (in minutes) for both SPT methods (see Figure 54B). These results show that the trajectories obtained with the adaptive algorithm are remarkably longer than those obtained with C&G, rendering less biased and more accurate description of the neutrophil migration dynamic system. We finally compared the algorithm with u-track (supplementary note 6). U-track renders shorter trajectories possibly because it fails to detect unusually long displacements. For tracking objects in dense environments, u-track restricts the search radius using a priori knowledge of particle dynamics. However, this feature comes at the price of missing unexpectedly long displacements while the adaptive algorithm is more flexible for these types of dynamics.

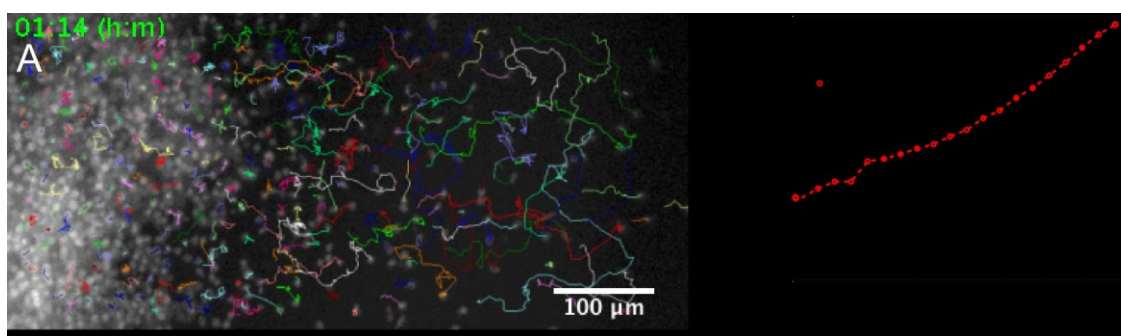


Figure 54. **Adaptive algorithm applied to neutrophils migrating under agarose**

(A) Sample frame with superimposed trajectories. See Film 9. (B) Cumulative tracked length (in minutes) of the trajectories of neutrophils versus length of individual trajectories (in minutes): C&G (continuous line), Adaptive (dashed line). Imaged at 4 frames per minute.

4. Conclusion

The field of particle tracking has evolved significantly during the last two decades, allowing to perform in very challenging conditions such as dense systems, blinking particles, and low quality images. Several methods assume dynamic models of particle movement to face some of these challenges, but these assumptions may in certain cases bias results if the behavior of the system is not fully characterized *a priori*.

In this work we propose a novel approach for optimizing the performance of the popular nearest-neighbor SPT algorithm by C&G in systems with inhomogeneous particle density. This method adapts the parameter mD to the local density of the particles both in space and time, boosting the tracking performance dramatically. Furthermore, even in systems that are not manifestly

inhomogeneous, the standard nearest neighbor algorithm is unstable due to slight variations of density that make the computation time to increase abruptly. Our improvement prevents these situations, providing the robustness needed for high content studies. Finally, this approach can be applied to more complex methods (Jaqaman, et al. 2008a) and potentially other algorithms that depend on a parameter equivalent to mD (Chenouard, et al. 2013).

We demonstrate quantitatively the advantages of the adaptive method by comparing it with the standard C&G algorithm and other state of the art methods using numerical simulations and experimental data.

Acknowledgements

Funding: This work was funded by grants from the Fondation de l'Hôpital Maisonneuve Rosemont (La néphrologie et son Impact) to SL, and the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) to SC. SC and SL are recipients of salary awards from Fonds de la Recherche en Santé du Quebec (FRSQ). JM is a recipient of a postdoctoral fellowship from the Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (La néphrologie et son Impact). JR was supported by funds from the NSERC-CREATE Training Program in Neuro-Engineering and an FRQS doctoral scholarship.

Supplementary Information

Supplementary Note 1: Results of SPT challenge

Supplementary Note 2: Detection method for near resolution-limited objects

Supplementary Note 3: Detection method for neutrophils

Supplementary Note 4: Optimization of Neighborhood Size Φ

Supplementary Note 5: Tracking of particles with unknown dynamics

Supplementary Note 6: Comparison between the Adaptive method and u-track

Supplementary video 7: SPT of inhomogeneous system ($\gamma=6$) using C&G algorithm

Supplementary video 8: SPT of inhomogeneous system ($\gamma=6$) using Adaptive algorithm

Supplementary video 9: SPT of Neutrophils migration using Adaptive algorithm

Supplementary Note 1: Results of SPT challenge

The adaptive approach proposed here has been designed to improve the tracking under inhomogeneous environments and, to the best of our knowledge, no other SPT method has been designed to treat such conditions. For this reason, there are no published results against which we can compare the performance of the method. However, in order to assess the performance of our method under other typical challenging conditions (overall particle density, type of movements, etc.) we test the adaptive algorithm with the SPT challenge described in (Chenouard, et al, 2014). This also permits to compare the performance of the method with other state-of-the-art SPT methods, at least under homogeneous conditions.

The rules for the challenge are detailed in (Chenouard, et al, 2014). Shortly, a set of realistic movies representing typical inputs for SPT problems, were generated numerically and provided to the participating teams, for them to track. In the actual contest that originated the paper, a first set of movies was provided along with the associated ground truth, for the teams to tune the parameters of the method. In a later stage, the actual challenge movies were provided, this time without the ground truth information. We skipped the training set, and processed the challenge set straightforward, but we didn't use the ground truth of the challenge to set any parameter. The algorithm was used with the same set of parameters that we used to generate the figures in the main paper.

The challenge test the methods under different values of three conditions:

- Scenario: Vesicles(2D), Microtubules(2D), Receptors(2D), and Viruses(3D).
- Particle density: Low, Mid, and High.
- SNR: 1, 2, 4, 7.

The adaptive method has been (so far) implemented for 2D tracking, therefore we didn't analyze the Virus scenario. Likewise, the method is concerned with tracking and not detection, therefore there is no point in considering the effects of SNR. We used the images with $\text{SNR} = 7$.

In order to evaluate the methods, the developers of the challenge devised a set of measures that describe various aspects of the performance. We are only concerned with tracking, so we skip all the measures for evaluating the detection algorithms. We used:

- $\alpha(X,Y) = 1 - d(X,Y) / d(X,\Phi)$
- $\beta(X,Y) = (d(X,\Phi) - d(X,Y)) / (d(X,\Phi) + d(Y_s,\Phi))$
- $JSC_\theta = TP_\theta / (TP_\theta + FN_\theta + FP_\theta)$

where X and Y are the ground truth and estimated sets of tracks, respectively, and $d(X,Y)$ is the total distance between tracks in X and Y . In $d(X,\Phi)$, Φ denotes a set of dummy tracks matching X , and in β , Y_s is the set of spurious tracks. TP_θ , FN_θ , and FP_θ stand for true positive, false negative, and false positive entire tracks. In summary, $\alpha(X,Y)$ indicates the overall degree of matching of ground truth and estimated tracks omitting the effect of nonpaired estimated tracks. $\beta(X,Y)$ is essentially $\alpha(X,Y)$ with a penalization for nonpaired estimated tracks. Finally, JSC_θ is the Jaccard similarity coefficient for tracks and characterizes the overall performance of tracking.

	α									β									JSC θ								
	Vesicles			Microtubules			Receptors			Vesicles			Microtubules			Receptors			Vesicles			Microtubules			Receptors		
	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High	Low	Mid	High
Method 1	1	1	1	5	5	5	2	12	3	1	2	1	5	5	6	2	12	3	10	7	3	4	5	5	4	12	3
Method 2	10	8	9	3	2	2	11	8	5	10	7	7	3	2	2	11	8	7	5	6	5	1	1	1	11	10	8
Method 3	8	3	5	NA	NA	NA	7	1	1	6	3	9	NA	NA	NA	7	1	1	3	2	11	NA	NA	NA	1	1	1
Method 4	NA	NA	NA	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2	2	NA	NA	NA
Method 5	3	4	2	2	3	3	4	3	8	2	4	3	2	3	4	3	3	8	7	5	2	3	3	4	2	4	5
Method 6	7	7	10	9	11	10	5	7	9	8	9	10	10	11	10	4	7	9	9	9	7	9	10	10	10	7	11
Method 7	14	11	8	NA	NA	NA	13	13	13	13	10	5	NA	NA	NA	13	13	13	1	1	1	NA	NA	NA	13	13	13
Method 8	2	2	3	4	8	12	3	6	7	3	1	2	4	8	12	6	4	5	8	3	6	11	12	12	6	3	4
Method 9	9	10	6	6	7	6	9	5	6	9	11	6	6	7	5	9	6	6	6	13	8	6	6	6	5	5	7
Method 10	11	14	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14	14	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14	14	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Method 11	4	6	7	10	4	4	1	2	2	5	6	8	9	4	3	1	2	2	4	4	4	5	4	3	2	2	2
Method 12	5	9	13	8	12	11	6	10	12	4	8	13	8	12	11	5	10	12	2	8	12	10	11	11	8	11	12
Method 13	12	12	11	11	10	9	10	9	11	11	12	11	11	10	9	10	9	11	11	10	10	7	8	9	7	8	10
Method 14	13	13	12	12	9	8	12	11	10	12	13	12	12	9	8	12	11	10	12	12	13	8	7	7	12	9	9
Adaptive	6	5	4	7	6	7	8	4	4	7	5	4	7	6	7	8	5	4	13	11	9	12	9	8	9	6	6

Tableau IX. SPT challenge ranking

Ranking of all methods participating in SPT challenge (Chenouard, et al. 2014) and the Adaptive tracking (highlighted row), for three performance measures under several conditions. The numbers indicate order in the ranking (1: best, 15: worst). The ranking was computed with a modified version of supplementary table 2 in (Chenouard, et al. 2014)

Since we are only concerned with the tracking it was tempting to use the particle positions from the ground truth and apply our algorithm to it. However, the three performance measures above depend on the detection, because a missed detection can make a track to split in two. For this

reason, to make the comparison fair with the other methods, we used the as simple detection algorithm, described in supplementary note 2, to obtain the particle locations.

We processed the movies of each condition with the Matlab implementation, and exported the result to the XML (extended markup language) format required by the challenge. We compute the three performance measures with the java program provided by the challenge organizers by running the commands:

```
java -jar trackingPerformanceEvaluation.jar -r GT.xml -c ET.xml  
-o results.txt
```

where GT.xml and ET.xml contain the ground truth and the estimated tracks, respectively, for each condition.

Finally, we introduced our results in the Microsoft Excel spreadsheet in Supplementary Table 2 of (Chenouard, et al. 2014), with which we computed the ranking of methods. The final results are presented in Tableau IX.

Overall, the Adaptive method ranks in the first half (1 to 7) in 70% of the tested conditions and measures, getting an average rank of 6.9. Notably, the ranking tends to improve for high density compared with low and mid conditions, and it is also better for vesicles and receptors than for microtubules. The last effect may be due to inadequate detection of anisotropic blobs (isotropic detection was used), rather than inadequacy for directed particle dynamics, since the ranking of JSC_{θ} for receptors (switching between random and directed motion) ranks better than for vesicles (purely random motion).

It is worth pointing out that these results fail to report the improvement that the adaptive method produce in conditions of inhomogeneous density of particles because the scenarios of the challenge consist on homogeneously distributed particles. In fact, in terms of particle density, these scenarios are equivalent to the condition explored in Figure 52E of the paper for $\gamma=1$. In this condition, C&G and the adaptive algorithm render indistinguishable performance, therefore there is no reason to expect that the adaptive algorithm will outperform the other algorithms on the scenarios of the challenge.

In summary, these results show that at least under the homogeneous scenarios of the challenge, the adaptive tracking renders results fairly comparable with state of the art methods, regarding α , β , and JSC_0 .

Supplementary Note 2: Detection method for near resolution-limited objects

In order to test the adaptive tracking algorithm on the datasets of the particle tracking challenge (supplementary note 1) we implemented a simple detection algorithm.

On each image we:

1. Apply spatial band-pass filter (difference of gaussians) to enhance features of a specified size range, in order to reduce the impact of noise (small objects) and large objects. For all conditions of the SPT challenge we enhanced objects between 4 and 6 pixels wide.
2. Binarize the filtered image with a threshold determined on each image (Otsu, 1979) to find local maxima candidates.
3. Iterate over all candidates and keep only those pixels which are a local maximum within a square neighborhood of the estimated size of objects.
4. Refine the object position by computing the intensity-weighted centroid on a neighborhood of the estimated size of the objects.

Supplementary Note 3: Detection method for neutrophils

The detection method used to measure the position of neutrophils is similar to near-resolution limited objects but with some differences.

On each image we:

1. Apply spatial band-pass filter to enhance features of a specified size range, in order to reduce the impact of noise and large objects. For all conditions of the SPT challenge we enhanced objects between 4 and 30 pixels wide.
2. Binarize the filtered image with a threshold determined on each image (Otsu 1979) to find local maxima candidates.

3. Iterate over all candidates and keep only those pixels which are a local maximum within a square neighborhood of the estimated size of objects.
4. Correct for multiple peaks corresponding to the same object. The reason for this correction is that neutrophils often stretch during migration generating two peaks on the same cell. To solve this, we search for peaks where the image intensity between them is relatively high and keep only the brighter, discarding the other one.

Supplementary Note 4: Optimization of Neighborhood Size Φ

For the adaptive tracking algorithm, the mD parameter varies along x , y , and t in order to limit the displacement of particles, strictly within the regions of high density of particles, without limiting them in the regions where particles are sparse.

We do this by making $mD(x,y,t)$, at each frame t , proportional to the map of nearest-neighbor distances $D(x,y)$. However, $D(x,y)$ has fast spatial fluctuations produced by particles that approach each other momentarily. These fluctuations do not represent the real density of particles, and produce fluctuations of mD that render suboptimal tracking performance. To solve this, we replace $D(x,y)$ by a version $D_\Phi(x,y)$ averaged along space and time, where Φ is the diameter of the circular neighborhood used to compute the average.

In order to illustrate the procedure to find the optimal value of Φ , we processed one of the inhomogeneous time series used in Figure 52 (with $\gamma = 6$) with the adaptive algorithm, using different values of Φ . In Figure 55 A-E we display $D_\Phi(x,y)$ in color coded images for some values of Φ , and in Figure 55 F we plot the performance descriptors for several values of Φ , ranging from 1 to 200.

If $\Phi = 1$ pix the performance is suboptimal because no spatial average is computed, according to the explanation above (Figure 55A). Besides, if Φ is too big (i.e. $\Phi = 200$ pix, Figure 55E) the performance is also suboptimal because the real variations of density are averaged away and mD is no longer well adapted to the local density of particles. The optimal performance is obtained for this specific time series for $\Phi \sim 10$ pixels (Figure 55C).

When processing experimental data, where ground truth is absent, the parameter Φ can be estimated by maximizing the number of tracked bonds (true and false positives), and the average trajectory length.

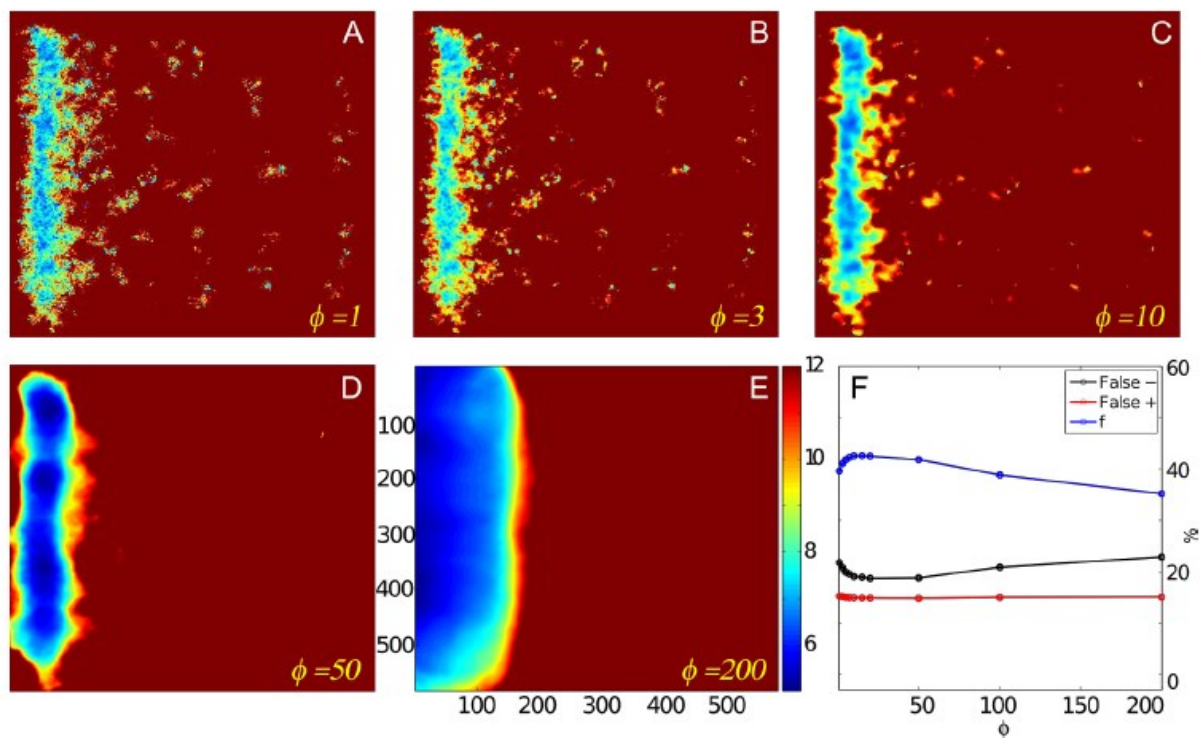


Figure 55. **Nearest neighbor distance maps**

(A-E) Color coded averaged nearest neighbor distance maps, for several sizes of the averaging neighborhood (1, 3, 10, 50, and 200, respectively). Colors blue to brown represent inter-particle distances from 5 to 12 pixels, respectively. (F) Performance descriptors of the adaptive tracking algorithm applied to an inhomogeneous time series with $\gamma = 6$, and parameters equivalent to series used in Fig 4, versus the neighborhood size Φ in pixels.

Supplementary Note 5: Tracking of particles with unknown dynamics

Tracking of particles under challenging conditions such as noisy or cluttered environments, or where particles are highly dense, have been addressed by several methods developed in the last decade (Meijering, et al. 2012). Most of these methods use a priori information about the system for determining the links between detected particle positions. One popular example is the method utrack, proposed by (Jaqaman, et al. 2008b). Utrack is able to

track particles that undergo random diffusion, linear motion, or switch between these dynamics, under noisy and dense environments, giving outstanding results.

This method computes the maximum allowed displacement (searchRadius) for each particle at each frame by using dynamical information from previous frames. For each trajectory, it assumes that particle displacements are normally distributed and uses the previous steps to estimate the distribution parameters ($\langle\delta\rangle$ and $\sigma\delta$). Finally, the searchRadius is set as

$$\text{searchRadius} \leftarrow 3 \sigma\delta$$

This assumption is a good estimate for several systems, but when the particle dynamics is unknown it may bias the results. For example, if a particle has been moving during some frames with normally distributed steps and suddenly it makes an abnormal long step the link is discarded and the trajectory interrupted. Migrating cells, where dynamics are typically complex and hard to predict, are a good example of such a scenario. Cells interact with each other and can change dynamics suddenly, for example after sensing a chemotactic cue that trigger different migration characteristics. When tracking such systems, methods that assume normally distributed steps can fail to detect these displacements, while a simpler nearest-neighbor approach is preferred since it does not make any assumption about the particle step statistics.

To prove this, we have first simulated numerically the trajectories of 440 objects during 100 frames, that move typically under random diffusion with displacements distributed normally (mean = 1 pix, SD = 0.25), and that undergo unusually longer displacements of size J and duration W, five times per trajectory (Figure 56). We studied the tracking performance of several methods as a function of the parameters J and W.

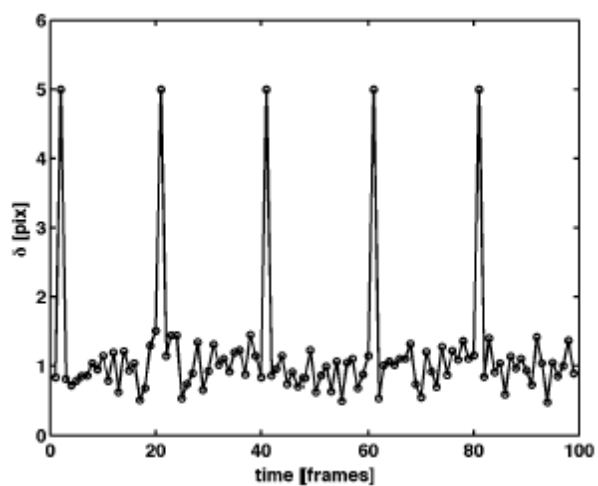


Figure 56. **Typical displacement of a randomly diffusing particle**

Typical displacement of a randomly diffusing particle that undergoes unusually long displacements ($J=5\text{pix}$ and $W=1$ frame) vs. time.

Adaptive Algorithm	U-Track
minDisplacement = 0; toMaxDisplacement = 12; combinationsTolerance = 5E4; $\phi = 10$;	<p>Gap Closing timeWindow = 1; mergeSplit = 0; minTrackLen = 2;</p> <p>Cost matrix for frame-to-frame linking funcName = 'costMatRandomDirectedSwitchingMotionLink'; linearMotion = 0; minSearchRadius = 0; maxSearchRadius = 12; brownStdMult = 3; useLocalDensity = 0 and 1; nnWindow = gapCloseParam.timeWindow; kalmanInitParam = [];</p> <p>Cost matrix for gap closing funcName='costMatRandomDirectedSwitchingMotionCloseGaps'; linearMotion = 0; minSearchRadius = 0; maxSearchRadius = 12; brownStdMult = 3*ones(timeWindow,1); brownScaling = [0.25 0.01]; timeReachConfB = timeWindow; ampRatioLimit = [0.7 4]; lenForClassify = 5; useLocalDensity = 0; nnWindow = timeWindow; linStdMult = 1*ones(timeWindow,1); linScaling = [0.25 0.01]; timeReachConfL =timeWindow; maxAngleVV = 30; gapPenalty = 1.5;</p> <p>Kalman filter function names reserveMem = 'kalmanResMemLM'; initialize = 'kalmanInitLinearMotion'; calcGain = 'kalmanGainLinearMotion'; timeReverse = 'kalmanReverseLinearMotion';</p>

Tableau X. Parameters and options used for the Adaptive algorithm and U-Track

We have processed the trajectories with both the adaptive algorithm and utrack using the parameters listed in Table 2. The results shown in Figure 57 show that the performance of utrack gets worse as the length of the unusual displacement increases (Figure 57A), and it fails to detect most unusually long displacements (Figure 57B), while the adaptive algorithm shows a remarkably better performance. This effect increases as the size of the unusual step increases, but only happens when $W = 1$ frame (Figure 57C and D). When $W \geq 2$ frames, u-track is able

to adapt to the unusual step size and the performance increases to values similar to the adaptive algorithm. The adaptive algorithm performs better than u-track in this case because it does not assume a specific displacement distribution.

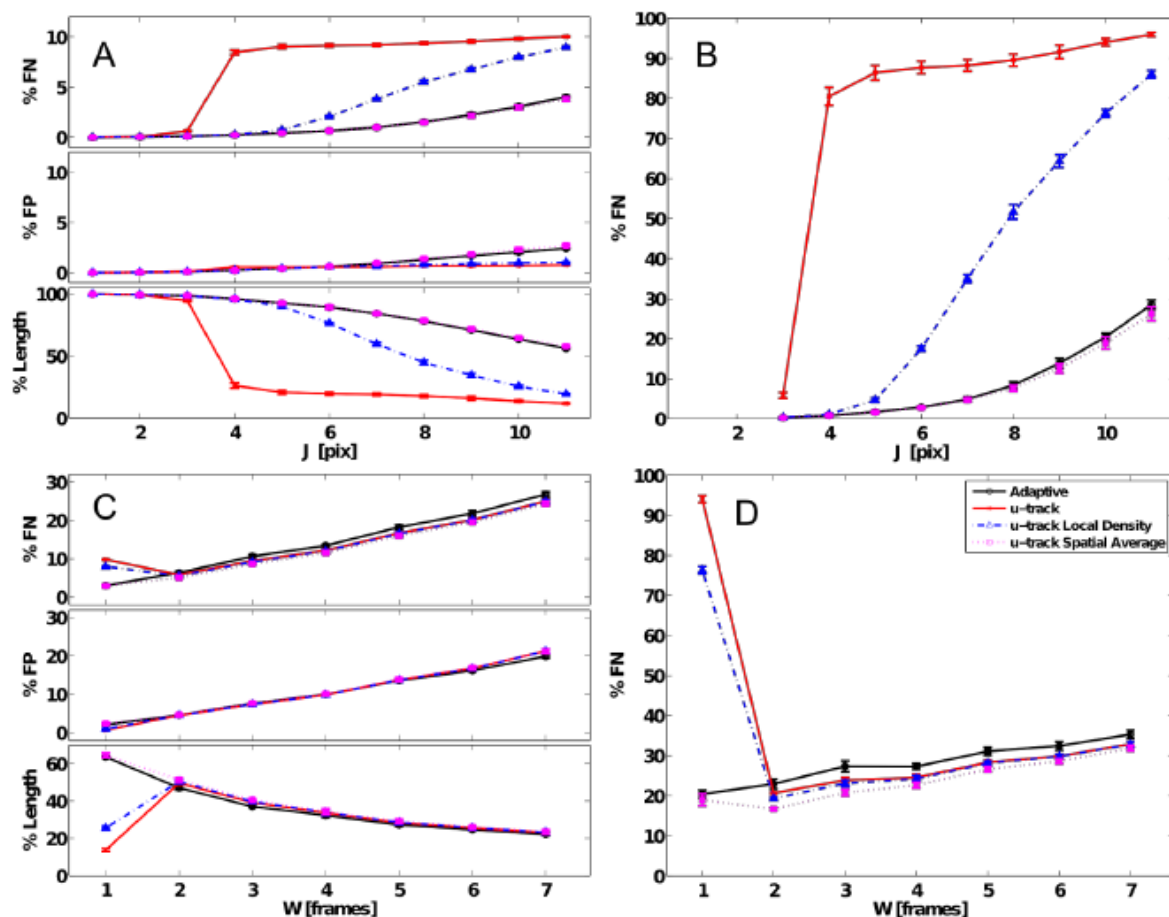


Figure 57. **Performance of tracking algorithms for unusually long displacements**

Performance of tracking algorithms on trajectories with unusually long displacements for the adaptive method (black), u-track with useLocalDensity set to 0 (red), u-track with useLocalDensity set to 1 (blue), and a modified version of u-track that uses a spatially averaged nearest-neighbor (magenta). A) False negatives, false positives, and average tracked length vs. the length J of the unusually long steps of duration $W=1$ frame. B) percentage of false negatives when considering only the unusually long steps vs. J . C) Idem A but for $J=10$ pix and vs. the duration W of the unusual steps. D) Idem B but vs. W ($J = 10$ pix). Error bars denote standard deviations for repetitions with seeds 1 to 5.

We also tested the performance of u-track setting useLocalDensity = 1 in both the linking and gapclosing cost matrices (u-track Local Density). With this setting, u-track extends the search radius using particle local density information so that

$$\begin{aligned} &\text{if (searchRadius} < \tfrac{1}{2} \text{ nnD) then} && \text{(eq. S1)} \\ &\quad \text{searchRadius} \leftarrow \tfrac{1}{2} \text{ nnD} \end{aligned}$$

where nnD is the minimal distance to the nearest object along previous frames of the trajectory. The results in Figure 57 show that enabling useLocalDensity increases u-track performance but it is always worse than adaptive algorithm.

Finally, we modified u-track to improve the robustness to unusually long trajectories (u-track Spatial Average). We changed the functionality of “useLocalDensity” so that

$$\begin{aligned} &\text{if (searchRadius} < D\Phi(x,y) \text{) then} && \text{(eq. S2)} \\ &\quad \text{searchRadius} \leftarrow D\Phi(x,y) \end{aligned}$$

where $D\Phi(x,y)$ is the spatiotemporal average of the nearestneighbor distance, as defined in section 2.3 of the paper. This approach improves remarkably the robustness of utrack to unusually long displacements Figure 57. We initially thought that the difference between “utrack Spatial Average” and “utrack Local Density” was due the $\frac{1}{2}$ factor in eq.S1. However, although setting this factor to 1 (or even 2) improves the robustness to unusual long displacements (results not shown), it is never as good as “utrack Spatial Average” or the adaptive algorithm.

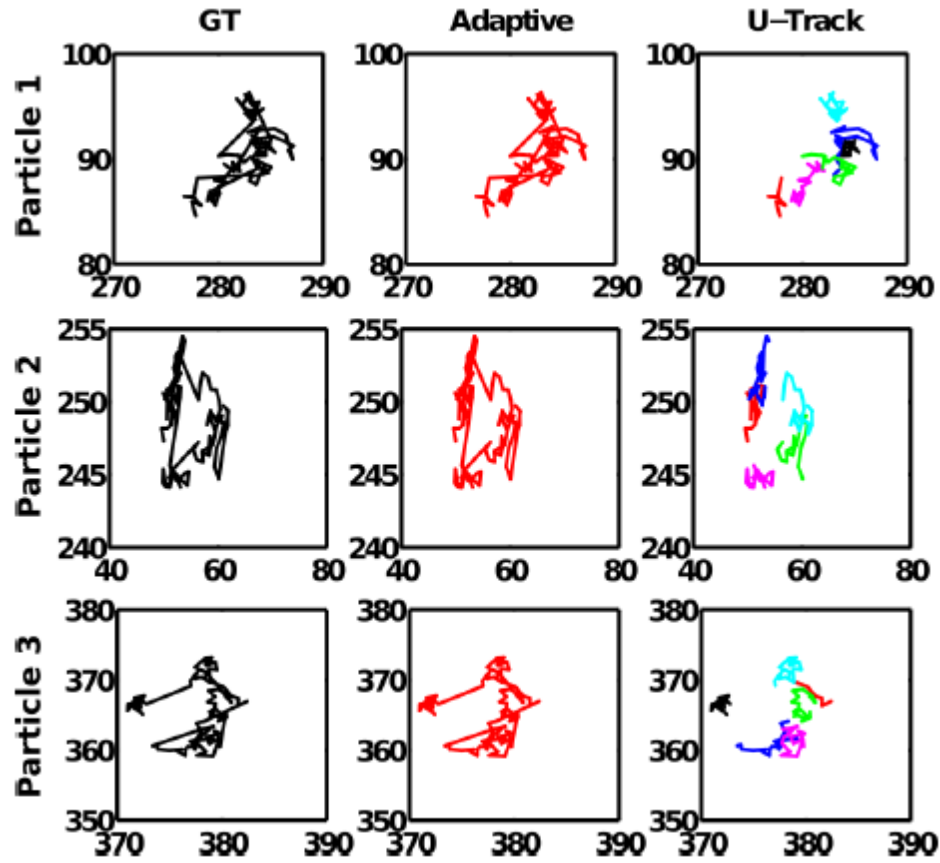


Figure 58. **Examples of 3 trajectories undergoing unusually long displacements**

Most steps are normally distributed with mean = 1 and standard deviation 0.25, and each trajectory has 5 unusually long displacements of size $J = 5$ pixels and duration $W = 1$ frame. The three columns, from left to right, correspond to: ground truth, the result of the adaptive algorithm, and the result of utrack, respectively. Both horizontal and vertical scales are in pixels and denote coordinates within the image.

It should be mentioned that both the adaptive algorithm and “utrack Spatial Average” render more false positives than utrack, but the resulting tracked length shows that the final balance favors the adaptive algorithm (and “utrack Spatial Average”) over “utrack” (and “utrack Local Density”). Although the aim of eq. S1 is to make sure that false positive links are minimized, it seems to be too restrictive when long displacements are expected. For such cases, eq. S2 gives better results.

In order to further illustrate the problem of unusually long displacements, in Figure 58 we plot the simulated trajectories of three particles (rows), where the three columns correspond to groundtruth, adaptive algorithm, and u-track, respectively. In all cases, the trajectories detected with utrack are interrupted each time the object undergoes an unexpected long displacement, while the adaptive algorithm renders the whole track.

In Figure 59 we show the histogram of particle displacements obtained from the ground truth, the Adaptive algorithm, and u-track with useLocalDensity = 0 (mean step = 1 pix, SD = 0.25 pix, unusual step J = 5 pix, and W = 1 frame). This result shows again that u-track fails to detect most unusually long displacement at $\delta = 5$ pix, while the adaptive algorithm does not miss them. For this reason, we consider that the adaptive algorithm proposed here is a better choice for systems in which particles can make unusually long displacements, such as cell migration.

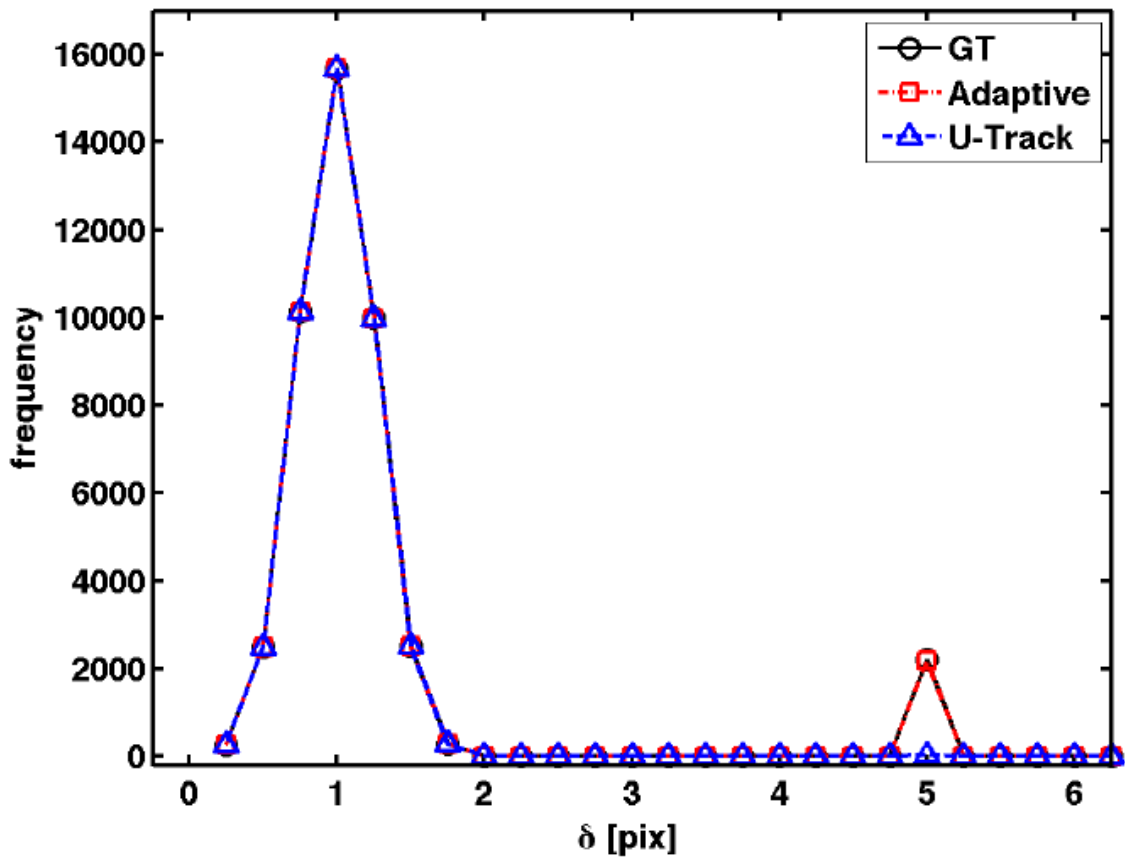


Figure 59. **Distribution of particle displacement**

Distribution of particle displacements for the ground truth, the Adaptive algorithm and utrack, on a set of trajectories that undergo unusually long displacements. Ground truth parameters: $\langle \delta \rangle = 1$ pix, $\sigma = 0.25$ pix, $J=5$ pix, $W = 1$ frame.

Supplementary Note 6: Comparison between the Adaptive method and utrack

We compared the performance of the adaptive algorithm to the tracking algorithm of u-track (Jaqaman, et al. 2008b) on inhomogeneous density movies, using the numerical simulations used in Figure 52E of the paper. The algorithms were applied with the parameters in table 2 (u-track parameter “useLocalDensity” was initially set to 0). The performance results are shown in Figure 60. Analogously to Figure 52E on the paper, the performance of C&G is severely hampered when the particles become inhomogeneously distributed, and the adaptive algorithm greatly improves it. U-track performs indistinguishably from C&G and the Adaptive algorithm for homogeneously distributed particles ($\gamma = 0$), and it is slightly better than the adaptive algorithm in highly inhomogeneous conditions ($\gamma = 4, 5, 6$). The version of u-track with useLocalDensity = 1, and the modified version we described in Supplementary note 5, show performance indistinguishable from u-track on the data in Figure 60 (results not shown). This proves that the performance difference between u-track and the adaptive algorithm on this numerical simulation is not due to the track based search radius of u-track, since both “Local Density” and “Spatial Average” versions of u-track disable this feature. Besides, the small difference is possibly originated on the dense regions of the movie, where u-track is known to perform especially well.

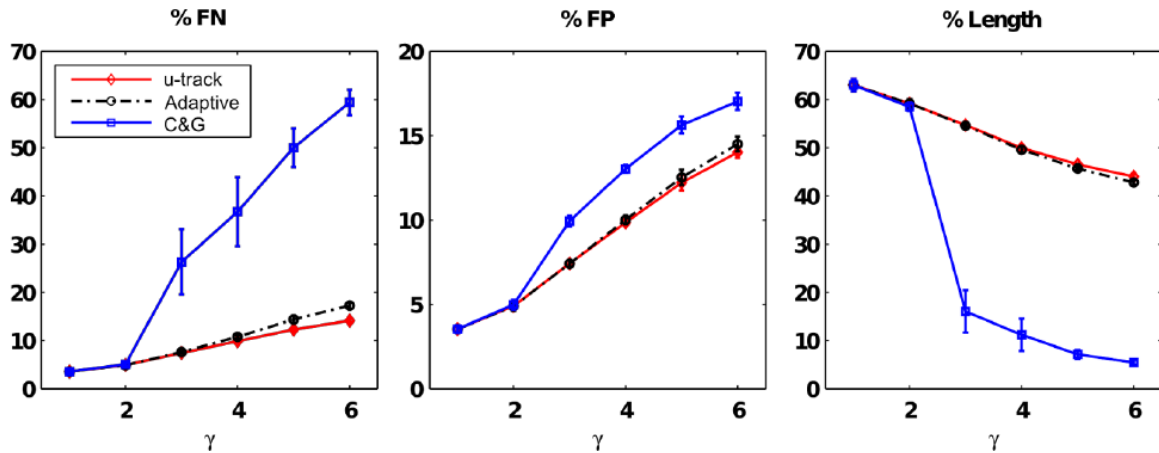


Figure 60. Tracking performance of spatially inhomogeneous time series

All trajectories sets G were numerically generated with $N = 400$, $F_{\max} = 100$ frames, $\langle \delta \rangle = 4$ pix, $\sigma_{\delta} = 1$ pix, and $D = 24$ pix. The initial positions of particles were redistributed with eq. 3 for several values of γ . The plots show performance descriptors for the standard C&G (blue lines), Adaptive (black lines), and utrack (red lines) algorithms as a function of γ . Error bars indicate the standard deviation for time series generated with seeds 1 to 5.

For comparing the methods on real experimental conditions, we applied the tracking algorithms to the neutrophils assay example (Figure 61 A and section 3.5 of the paper), after the detection method described in supplementary note 3. In Figure 61B we show the cumulative tracked length for all tested methods. As it was already shown in Figure 54 of the paper, the trajectories obtained with the adaptive algorithm are longer than with C&G. Additionally the total tracked distance is greater for the adaptive approach. The trajectories obtained with u-track (useLocalDensity = 0, maxSearchRadius = 25 pix) are longer than C&G, but shorter than with the adaptive algorithm for trajectories longer than 17 minutes. When all trajectories are included, u-track has total tracked length longer than the adaptive algorithm, possibly because of its better performance on the denser regions. In fact, if we consider only the tracks on the 60% to the right (Figure 54A), where cells are sparser (Figure 54A and C), the adaptive algorithm shows tracked length longer than u-track.

Since there is no ground truth, it is difficult to analyze thoroughly the performance of these methods on the experimental data. However, we hypothesize that u-track renders shorter tracks than the adaptive algorithm because of the unusually long displacements that cells undergo, according to the analysis of supplementary note 5. In order to address this, we use the trajectories produced by the adaptive algorithm (because they are longer) and search for unusually long displacements. Then we count how many of them are missed from the u-track results.

We consider a displacement to be unusually long when

$$\delta_L > (\langle \delta \rangle_5 + 3\sigma_{\delta 5})$$

where $\langle \delta \rangle_5$ and $\sigma_{\delta 5}$ are the mean and standard deviation of the displacements in the previous 5 frames. In the examples shown in Figure 61D and F (bottom) we marked with a red cross three cases of long displacements from adaptive algorithm trajectories that were missed by utrack (Figure 61D and F, top). Quantitatively, from the 1300 trajectories rendered by the adaptive algorithm in the rightmost 60% of the movie, we detected 950 unusually long displacements

from which 23.5% were missed by u-track. By doing the opposite, from the 1850 trajectories detected by u-track in the same movie region, we detected 775 unusually long displacements from which only 5.8% were missed by the adaptive algorithm. These results show that u-track misses more unusually long displacements than the adaptive algorithm, and suggests an explanation of why u-track renders trajectories shorter than the adaptive algorithm.

U-track Local Density renders trajectories that are longer than standard u-track (Figure 61B and C), and it misses less long displacements (16.5% of those from adaptive algorithm). Finally, u-track Spatial Average yields the longest trajectories and it only misses a small fraction of the unusually long displacements (1 %).

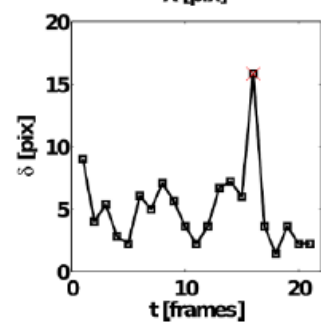
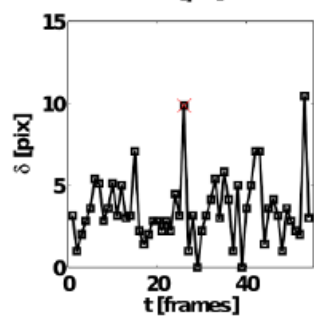
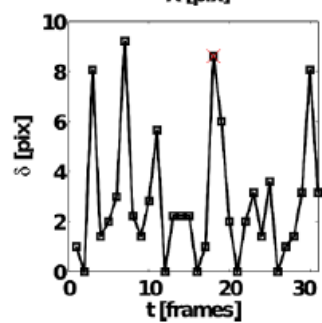
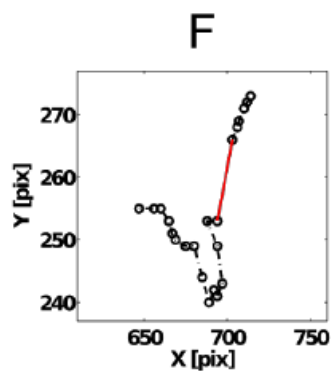
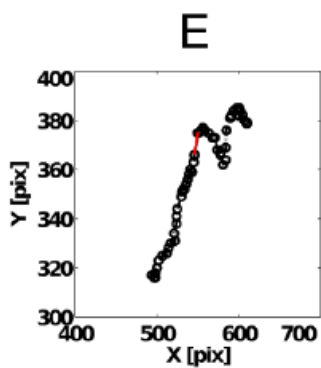
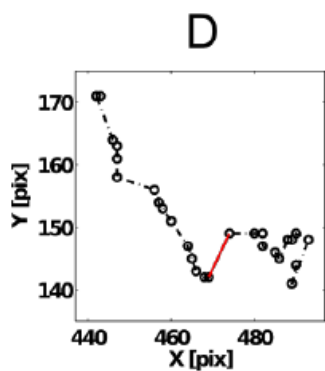
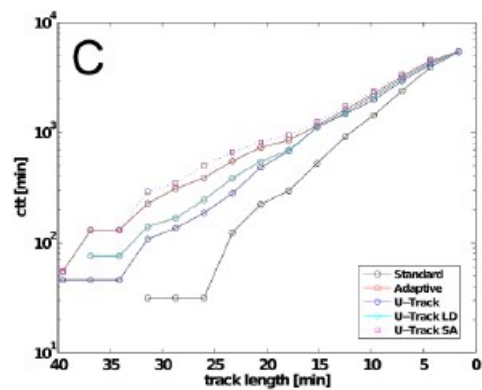
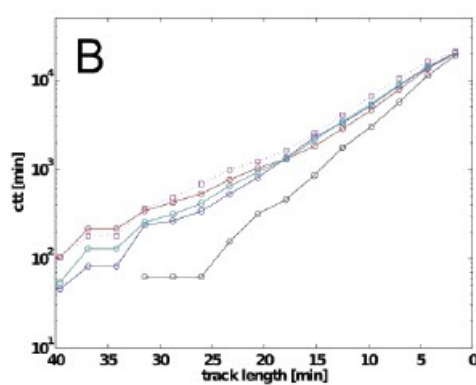
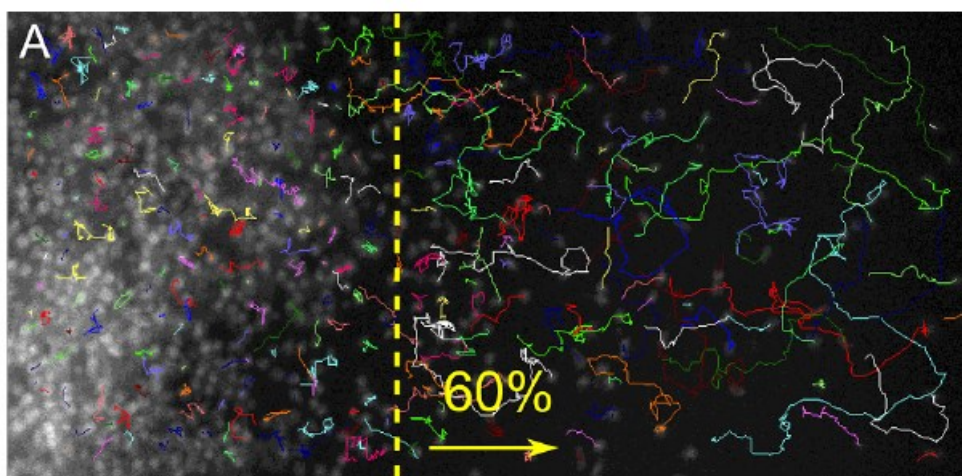


Figure 61. Comparison of methods on the neutrophils assay

(A) One frame of the movie with adaptive algorithm trajectories superimposed. (B) cumulative tracked length vs. trajectory length for several tracking methods. (C) Idem B, only for trajectories on the rightmost 60% fraction of the movie. (D and E) Examples of trajectories detected by the adaptive algorithm that have long displacements missed by utrack (red segments on the top plots). Bottom: Plots of the displacements for the tracks above. The red cross indicates the displacement missed by u-track. The trajectories were inspected visually along with the movie to ensure the long displacements are actual cell movements.

On spatially inhomogeneous particle systems that move with normally distributed displacements, u-track has a slightly better performance than the adaptive algorithm. However, both the analysis of supplementary note 5 and the results of the neutrophils assay suggest that when particle displacements are not normally distributed, u-track fails to detect the unusually long displacements yielding interrupted trajectories, even when the parameter `LocalDensity` is enabled. For such systems, the adaptive algorithm may be preferred.

U-track has high tracking performance on dense systems. In part, this advantage is due to a refined prediction of particle displacements based on dynamic models. U-track is a powerful tool for tracking systems where dynamics can be estimated accurately, but for objects with complex dynamics, or when the dynamics is still unknown, a simpler method as the adaptive algorithm can render more reliable results.

In summary, particle systems are diverse and no tracking method is optimal for all. The method proposed in this work can adapt the nearest-neighbor method to the local fluctuations of density without assuming any specific particle dynamics.

